

Roberto Rossetti

Manuale di Batteriologia clinica

Dalla teoria alla pratica
in laboratorio

MANUALI
BIOMEDICA

- 1 -

Manuali
Biomedica

1. Roberto Rossetti, *Manuale di Batteriologia clinica. Dalla teoria alla pratica in laboratorio*, 2005

Roberto Rossetti

Manuale di Batteriologia clinica
Dalla teoria alla pratica in laboratorio

Firenze University Press
2005

Manuale di Batteriologia clinica : dalla teoria alla pratica in laboratorio /
Roberto Rossetti. – Firenze : Firenze university press , 2005.

(Manuali. Biomedica, 1)

<http://digital.casalini.it/8884533802>

Stampa a richiesta disponibile su <http://epress.unifi.it>

ISBN 88-8453-308-2 (online)

ISBN 88-8453-309-0 (print)

616.014 (ed. 20)

Batteriologia

Editing di Baldo Conti

© 2005 Firenze University Press

Università degli Studi di Firenze

Firenze University Press

Borgo Albizi, 28

50122 Firenze, Italy

<http://epress.unifi.it/>

Printed in Italy

Sommario

L'Autore e i Collaboratori	xi
Presentazione	xiii
Introduzione. La microbiologia clinica	xv
La batteriologia clinica dalla teoria alla pratica in laboratorio: cenni storici	1
Capitolo I	
Caratteristiche generali	3
La popolazione batterica residente sull'uomo	4
Metodi di prelievo, raccolta, trasporto e conservazione dei campioni biologici	5
Indicazioni generali	5
Infezioni respiratorie: alte vie	5
Infezioni respiratorie: basse vie	6
Infezioni dell'apparato urinario e genitale	7
Infezioni dell'apparato digerente	10
Valutazione del campione biologico per l'esame colturale	13
Capitolo II	
Tecniche batteriologiche	15
La colorazione di Gram	15
I metodi colturali	15
Tecniche per la semina in piastra	16
Capitolo III	
Coltura dei materiali biologici	19
Emocoltura	19
Esame colturale del liquor cefalorachidiano	22
Esame colturale di materiali respiratori	23
Basse vie respiratorie	23
Alte vie respiratorie	26
Apparato uro-genitale	28
Apparato intestinale	32

Identificazione batterica	33
Capitolo IV	
Cocchi Gram positivi	35
Streptococchi	35
<i>Streptococcus pyogenes</i>	35
<i>Streptococcus agalactiae</i>	37
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	38
Streptococchi α -emolitici	40
Streptococchi non emolitici	40
Tipizzazione degli Streptococchi α e non emolitici	40
Enterococchi	41
Stafilococchi	43
<i>Staphylococcus aureus</i>	44
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	46
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	47
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	48
<i>Staphylococcus hominis</i>	49
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	49
Capitolo V	
Cocchi Gram negativi	51
Neisseriaceae	51
<i>Neisseria meningitidis</i>	51
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	53
<i>Moraxella catarrhalis</i>	55
Capitolo VI	
Bacilli Gram positivi aerobi	57
<i>Listeria</i>	57
Genere <i>Bacillus</i>	58
<i>Bacillus anthracis</i>	58
<i>Bacillus cereus</i>	59
Actinomiceti aerobi	60
<i>Corynebacterium</i>	60
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	60
Batteri corineformi (difteroidi)	61
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	62
<i>Nocardia</i>	62
<i>Rhodococcus</i>	63
<i>Erysipelotrix</i>	63
<i>Gardnerella vaginalis</i>	64
<i>Lactobacillus</i>	65
Schema per inquadrare a livello di genere i batteri Gram positivi rari o “difficili”	65

Capitolo VII**Bacilli Gram negativi**

<i>Enterobacteriaceae</i>	67
<i>Escherichia coli</i>	67
<i>Salmonella</i>	69
<i>Shigella</i>	70
Altre <i>Enterobacteriaceae</i> d'interesse clinico	71
<i>Citrobacter</i>	72
<i>Enterobacter</i>	72
<i>Klebsiella</i>	72
<i>Proteus</i>	73
<i>Providencia</i>	73
<i>Serratia</i>	74
<i>Yersinia</i>	74
<i>Vibrionaceae</i>	75
<i>Aeromonas</i>	75
<i>Vibrio</i>	76
Genere <i>Campylobacter</i> ed <i>Helicobacter</i>	77
<i>Campylobacter</i>	77
<i>Helicobacter</i>	79
<i>Pasteurellaceae</i>	80
<i>Pasteurella</i>	80
<i>Actinobacillus</i>	81
<i>Haemophilus</i>	81
<i>Pseudomonadaceae</i>	82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
<i>Burkholderia cepacia</i>	84
<i>Pseudomonas putida</i>	84
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	85
Altri batteri Gram negativi	85
<i>Acinetobacter</i>	85
<i>Alcaligenes</i>	86
<i>Flavobacterium</i>	86
<i>Legionella</i>	87
<i>Brucella</i>	88
<i>Bordetella</i>	89
<i>Eikenella</i>	90
<i>Francisella</i>	90
Schema per inquadrare a livello di genere i batteri Gram negativi rari o "difficili"	91

Capitolo VIII**Batteri difficilmente coltivabili**

<i>Borreliae</i>	93
<i>Bartonellae</i>	94

<i>Leptospiracee</i>	94
<i>Rickettsiae</i>	95
<i>Coxiellae</i>	95
Capitolo IX	
Batteri anaerobi	97
Caratteristiche generali	97
Cocchi Gram positivi	100
Cocchi Gram negativi	100
Bacilli Gram positivi asporigeni	100
<i>Actinomyces</i>	101
<i>Bifidobacterium</i>	102
<i>Eubacterium</i>	102
<i>Lactobacillus</i>	102
<i>Mobiluncus</i>	102
<i>Propionibacterium</i>	102
Bacilli Gram positivi sporigeni	103
<i>Clostridium perfringens</i>	103
<i>Clostridium botulinum</i>	104
<i>Clostridium tetani</i>	104
<i>Clostridium difficile</i>	104
Bacilli Gram negativi	105
<i>Bacteroides</i>	106
<i>Fusobacterium</i>	106
<i>Prevotella</i>	106
<i>Porphyromonas</i>	106
Caratteristiche differenziali di alcune specie di bacilli anaerobi Gram negativi	107
Capitolo X	
<i>Mycobacteriaceae</i>	109
Caratteristiche generali	109
Modalità di prelievo e norme di sicurezza	110
Esame microscopico	111
Terreni di coltura	111
Esame colturale	112
Identificazione	113
Saggio della sensibilità ai farmaci	114
Amplificazione	115
Caratteristiche salienti delle più comuni specie di micobatteri	117
Materiali e modalità di prelievo	118
Capitolo XI	
<i>Mycoplasmataceae</i>	119
Caratteristiche generali	119

Sommario	ix
Isolamento	119
Morfologia delle colonie	119
Identificazione	120
Capitolo XII	
<i>Chlamydiaceae</i>	121
Caratteristiche generali	121
Isolamento	121
Capitolo XIII	
Antibiogramma	123
Considerazioni generali	123
Metodi impiegati per i test di sensibilità	125
Metodo della diffusione da disco secondo Kirby-Bauer	125
Stafilococchi	128
<i>Streptococcus pyogenes</i>	130
Enterococchi	131
Streptococchi viridanti	131
Batteri anaerobi	131
Batteri produttori di β -lattamasi	132
Test di sensibilità eseguiti con l'impiego di strumentazione automatica	133
Capitolo XIV	
Controlli di qualità	135
I controlli di qualità nel laboratorio di microbiologia clinica	135
Siti internet consigliati	141
Indice analitico	143

L'Autore e i Collaboratori

Autore

ROBERTO ROSSETTI

Laureato in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Firenze e specializzato in Igiene e Sanità Pubblica presso l'Università degli Studi di Pisa.

Direttore di 5 Corsi Regionali di Microbiologia Clinica di cui 2 tenuti a Pistoia e 3 a Firenze, presso l'Istituto di Microbiologia dell'Università degli Studi, aperti a biologi e medici.

Insegnante di vari corsi d'Igiene e Microbiologia presso le Scuole per Infermieri Professionali dell'Ospedale "SS. Cosimo e Damiano" di Pescia (PT) e professore a contratto dell'Università degli Studi di Firenze per l'insegnamento di Microbiologia Clinica presso il Corso di Laurea per Infermieri Professionali nella sezione distaccata di Pistoia.

Relatore in molti Convegni e Congressi ed autore di numerose pubblicazioni su riviste italiane ed internazionali. Membro dell'AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani) come proboviro, membro del Direttivo Nazionale e Segretario Regionale per la Regione Toscana.

Direttore U.O. Microbiologia degli Spedali Riuniti di Pistoia.

Collaboratori

ENRICO TORTOLI

Laureato in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Firenze e specializzato in Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, presso l'Università di Camerino.

Corso di perfezionamento presso l'Unità di Micobatteriologia dell'Istituto Pasteur di Parigi.

Referente del Centro di Riferimento della Regione Toscana per la Diagnostica dei Micobatteri. Consulente della WHO.

Autore di 135 pubblicazioni scientifiche, delle quali oltre la metà su riviste internazionali *peer reviewed*. Fra di esse la review sui "nuovi" micobatteri pubblicata nel 2003 su Clin. Microbiol. Rev. Presentazione di oltre 100 relazioni o comunicazioni a congressi e incontri nazionali ed internazionali.

Invited speaker al 43° ICAAC (2003) ed al 104° Congresso della American Society of Microbiology (2004).

Più volte invitato a svolgere funzione di *referee* per le riviste: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., Tubercle Lung. Dis., Int. J. System. Evol. Microbiol., Appl. Environ. Microbiol., J. Chemother.

PIERANGELO PERELLI

Laureato in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Pisa. Application Specialist di Sistemi di Microbiologia presso importante Società del settore di diagnostica clinica.

Ha ideato e realizzato il progetto grafico del manuale presente sul CD-Rom (struttura web, trascrizione e impaginazione, disegno e animazioni).

Presentazione

Roberto Rossetti, è stato molti anni fa un mio studente e dopo la laurea ha frequentato per un certo periodo l'Istituto di Microbiologia quando ancora c'era il mio Maestro Renzo Davoli.

Ben presto è diventato adulto ed è entrato nella carriera dei laboratori ospedalieri, una tipica posizione di frontiera, alquanto distaccata dalla mia, quella accademica, che è abbastanza spesso un po' lontana dalla realtà. La vicinanza geografica e la frequentazione delle riunioni della Associazione Italiana Microbiologi Clinici, mi hanno comunque permesso di seguire sia la sua attività in laboratorio, sia la sua attività nell'organizzazione di convegni di aggiornamento e penso che questa ultima esperienza gli sia stata molto utile, come e forse più delle precedenti, in questa sua fatica che mi onoro di presentare.

Infatti, ormai alla vigilia del pensionamento, Roberto si è cimentato nella stesura di un manuale di "Microbiologia" ed ha avuto la bontà di chiedermi una presentazione, che presuntuosamente, come se fossi una persona importante, mi accingo a fare.

Il dattiloscritto rispecchia la lunga attività di laboratorista dell'autore, sopra tutto rivolta alla batteriologia diagnostica, e difatti s'intitola Manuale di Batteriologia. Scorrendolo e vedendo parte del CD-Rom che lo accompagna, mi sono reso conto che si tratta veramente di un "*manuale*", un libro, da tenere ben in vista su uno scaffale del laboratorio perché qualsiasi membro del personale, laureato o tecnico, possa consultarlo in ogni momento della giornata. Non dovrebbe però trovarsi solo nel laboratorio, di solito un po' appartato dalla vita dell'ospedale; la sua prima parte, infatti, è rivolta, più che ai laboratoristi, al personale dei reparti clinici e meriterebbe di essere replicata a parte e condensata sotto forma di schede da distribuire a chi, medico o infermiere, è direttamente a contatto con i malati.

Chiunque, sia pure da una posizione defilata come la mia, sa qualche cosa di indagini diagnostiche microbiologiche, conosce l'importanza sia delle modalità di prelievo (dal distretto giusto, al momento giusto), sia della conservazione e del trasporto dei campioni biologici, la cui modalità non sono sempre le stesse. Coglierei l'occasione, dato appunto la diversità sia del tipo di materiale sia delle modalità di conservazione a seconda delle varie categorie di batteri, per una affermazione che suonerà un poco strana ma che richiede invece la massima attenzione: quando si chiede un esame microbiologico bisogna sapere che cosa si cerca!

Le parti successive sono più strettamente legate con il laboratorio: le generalità di tecniche, la scelta dei terreni e dei mezzi di coltura per i vari tipi di materiali, l'identificazione delle specie batteriche e la corretta esecuzione dell'antibiogramma. Mi ha fatto molto piacere il fatto che l'autore, pur non tralasciando di menzionare le metodiche ipertecnologiche attuali, presenti le vecchie tecniche come l'isolamento di colonie

con l'“ansa”, un semplice vecchio sempre utile strumento che ci faceva dire quando si voleva disprezzare un collega: “Quello non sa neppure tenere l'ansa in mano!”. Roberto Rossetti sa ben tenere l'ansa in mano ed ha saputo anche descrivere come si fa, ma d'altra parte è ben aggiornato ed ha avuto l'accortezza di chiedere ad un esperto la preparazione di un CD-Rom, per il quale ha naturalmente fornito il materiale.

Questo mi porta ad una ulteriore considerazione sull'iconografia, certamente abbondante, ma sopra tutto molto buona, sia nel testo che nel CD-Rom.

Credo, augurando la diffusione del libro sia per i laboratori, sia per i corsi di laurea breve dei tecnici di laboratorio, di fare del bene all'università e all'assistenza sanitaria!

Guglielmo Gargani
Professore emerito di Microbiologia

Introduzione.

La microbiologia clinica.

“Ovvero del ragionamento applicato ad una disciplina di laboratorio”

La microbiologia clinica è il settore della diagnostica di laboratorio che costringe il professionista laureato ad un ragionamento logico prima di confermare il dato diagnostico e questo aspetto è, a mio avviso, il fatto più affascinante di una disciplina che ha trascinato tanti appassionati proseliti e studiosi per tutta la loro esistenza.

La necessità di dover stabilire una stretta correlazione tra il risultato ottenuto in laboratorio con l'indagine batteriologica impiegata ed il possibile o effettivo ruolo del microorganismo isolato nel processo infettivo in atto nel paziente, impone una capacità critica di controllo sul dato che, obiettivamente, non è necessaria in altri campi della diagnostica perché, in quel caso, sono stati predisposti strumenti diversi per assicurarsi dell'affidabilità del risultato.

In questo ambito non è pertanto necessaria solo la conoscenza astratta del problema ma è fondamentale anche un approccio corretto al lavoro che si acquisisce solo con l'esperienza e l'aggiornamento professionale e culturale.

In genere i libri di microbiologia clinica si pongono lo scopo di dare indicazioni sui microrganismi patogeni per l'uomo, su quali organi o apparati si manifesta l'infezione e sulle tecniche di laboratorio più valide per il loro riconoscimento, senza però scendere in dettagli descrittivi e con scarsa iconografia.

Il tentativo che vogliamo proporre con questo nostro volume, pur se limitato alla sola batteriologia, è quello di offrire al lettore, studente universitario o già impegnato in un laboratorio diagnostico, uno strumento agile, pratico e di pronto impiego, da consultare rapidamente in caso di bisogno, ma utile anche per contribuire all'aggiornamento professionale e migliorare costantemente la qualità del proprio lavoro.

Nel CD-Rom allegato al volume, abbiamo inserito molte fotografie, tratte dalla quotidiana esperienza di laboratori di batteriologia clinica, nelle quali sono evidenziate le caratteristiche microscopiche e colturali più importanti del batterio preso in considerazione, ottenute dai campioni biologici più rappresentativi dell'infezione da essi provocata. Per molti materiali biologici provenienti da sedi anatomiche di norma non sterili sono proposti numerosi casi con flora normale, altri con presenza di alcuni patogeni con flora mista ed altri con presenza di soli patogeni per il riconoscimento delle colonie tipiche per quel particolare terreno di coltura.

Sono stati inoltre inseriti anche brevi filmati che mostrano alcune tecniche e modalità di semina impiegate nella diagnostica di laboratorio.

Basandoci anche sulle indicazioni delle Società Scientifiche sono state proposte quelle che, a nostro avviso, sono le migliori modalità di raccolta, conservazione e trasporto dei materiali biologici per ottimizzare le possibilità di ritrovamento del patogeno.

Abbiamo anche indicato i percorsi più idonei per raggiungere una diagnosi di laboratorio utile e, talora, indispensabile per il clinico.

Con questa opera non abbiamo avuto la pretesa di coprire tutta la batteriologia clinica, ma abbiamo presentato almeno i più comuni patogeni riscontrabili nell'attività giornaliera di un buon laboratorio di Microbiologia clinica e per i quali ci siamo sforzati di inserire immagini originali tratte dalla nostra esperienza lavorativa. Per i microrganismi non menzionati nel volume o per quelli trattati non approfonditamente, si rimanda a manuali più corposi o alle riviste specializzate della materia.

Ci è sembrato utile proporre anche un elenco di siti Web, a nostro giudizio molto interessanti su temi generali o specifici di batteriologia, con la speranza d'invogliare il lettore ad ampliare le proprie conoscenze su un mondo ancora in parte da scoprire ed in costante cambiamento.

La batteriologia clinica dalla teoria alla pratica in laboratorio: cenni storici

Lo studio dei microrganismi è stato reso possibile solo quando è stato scoperto un sistema per poterli vedere e capire che esistevano veramente. Fino ad allora si era solo sospettata la loro esistenza o si erano formulate ipotesi fantasiose sulla possibilità che esseri sconosciuti fossero i veri responsabili d'alcune malattie dell'uomo.

Il primo a descriverne la forma con dovizia di particolari non fu uno scienziato, ma un mercante di stoffe, l'olandese Antony van Leeuwenhoek, grazie all'impiego di uno strumento ottico, il primo microscopio semplice a singola lente, da lui inventato alla fine del XVII secolo, che gli permise di ottenere circa 200 ingrandimenti necessari per avere una prima visione di alcuni batteri presenti in "un poco di materia bianca" prelevata dai propri denti.

Da allora, per circa due secoli, nessuno si avvicinò più a quel mondo invisibile fino a quando, nel XVIII secolo, furono costruiti i primi microscopi composti che permisero ingrandimenti più spinti.

Un ulteriore e fondamentale progresso per lo studio dei batteri fu ottenuto grazie all'impiego di alcune colorazioni, in particolare quella di Gram che differenziò i batteri in due grandi categorie (negativi e positivi alla sua colorazione) e permise di riconoscere la morfologia cellulare.

Ma il grande impulso allo studio della batteriologia avvenne grazie all'opera di illustri scienziati, in particolare Louis Pasteur e Robert Koch, che riuscirono a dimostrare, senza ombra di dubbio, la responsabilità diretta di alcuni batteri in alcune malattie infettive dell'uomo (carbonchio, tubercolosi, colera), grazie anche all'impiego di idonei terreni di coltura che permettevano la crescita dei batteri al di fuori dell'organismo infettato e quindi un loro studio più approfondito e diretto. Richard Julius Petri, un allievo di Koch migliorò nel 1887 le tecniche di coltura ed ebbe l'idea di utilizzare, per lo sviluppo microbico, dei contenitori in vetro particolari, le piastre di Petri, ancora oggi indispensabili strumenti di lavoro per il batteriologo [► FOTO].

Di fatto, con l'impulso avuto dalle loro importanti ricerche, nacque la batteriologia clinica, la scienza che studia i batteri causa di malattie nell'uomo, nell'intento di individuare il responsabile dell'episodio infettivo nel singolo paziente e permettere la scelta del farmaco antibiotico più attivo, in grado di bloccare la riproduzione batterica e quindi di far guarire il malato.

Capitolo I

Caratteristiche generali

Com'è noto i batteri sono stati i primi esseri viventi a popolare il nostro pianeta non appena furono rese possibili le condizioni per un loro sviluppo. Da allora questi organismi invisibili hanno colonizzato qualsiasi zona che permettesse loro la sopravvivenza ed, ovviamente, anche noi esseri umani, fin dal momento della nascita. In milioni di secoli d'evoluzione si sono talmente specializzati da prendere possesso, in maniera stabile, di alcuni distretti corporei creandovi delle vere e proprie nicchie ecologiche che risultano pertanto, di norma, tipicamente costituite da quei determinati microrganismi.

Risulta allora fondamentale sapere la collocazione e la tipologia dei batteri nelle sedi anatomiche non sterili del nostro organismo, anche per stabilire se un elemento appartenente a quella popolazione residente può essere considerato responsabile di un ben definito quadro infettivo.

In effetti la conoscenza della flora endogena residente nelle vari sedi corporee ci permette di fare importanti considerazioni sull'eventuale ruolo patogeno svolto in molte situazioni cliniche: mentre non risulta difficile, nella maggioranza dei casi, attribuire un ruolo patogeno ad un batterio isolato da un materiale biologico proveniente da sedi anatomiche di norma sterili, come il sangue o liquidi provenienti da organi cavitari interni è, spesso, molto più impegnativo individuare una responsabilità diretta di un batterio considerato di norma residente in un certo distretto da cui preleviamo un campione da inviare in laboratorio per l'esame colturale.

La cosa si complica non poco quando si eseguono prelievi da soggetti immunodepressi nei quali anche i batteri colonizzanti possono diventare patogeni veri a causa della ridotta o nulla attività del sistema immunitario dell'ospite.

Bisogna inoltre considerare anche che una certa percentuale della popolazione umana può albergare in alcune sedi anatomiche batteri considerati veri patogeni (pneumococchi, emofili, streptococchi β -emolitici, ecc.), ma che al momento non sembrano causare alcuna infezione e si riscontrano solo casualmente eseguendo un prelievo per un esame colturale.

In tutte queste circostanze può essere difficile interpretare il dato microbiologico che deve essere comunque attentamente vagliato prima di essere riferito al medico curante, il quale dovrà correlare la presenza del batterio con il quadro clinico presentato dal paziente e decidere di conseguenza se iniziare o meno una terapia antibiotica specifica per il germe segnalato.

In considerazione di quanto sopra affermato in microbiologia è della massima importanza la fase preanalitica: quando prelevare, cosa prelevare, dove eseguire il prelievo in modo da ottenere un campione biologico significativo dell'infezione in atto, come

eseguire il prelievo e con quali sistemi fare la raccolta dei materiali, la loro conservazione prima dell'invio in laboratorio ed il loro trasporto.

Se non si eseguono correttamente tutte queste fasi l'esito della coltura non solo può dare indicazioni erronee, ma può addirittura indurre a terapie inutili o dannose per il malato.

La popolazione batterica residente sull'uomo

Per definizione i distretti di norma sterili sono: il sangue, tutti i liquidi degli organi cavitari interni e tutti gli organi interni, tranne la parte prossimale di quelli che comunicano con l'esterno attraverso cavità rivestite da mucosa.

I distretti che presentano sempre una flora residente sono:

- 1) **Apparato tegumentario:** prevalenza di germi aerobi o anaerobi facoltativi, costituiti da stafilococchi (*Staphylococcus epidermidis*, altri stafilococchi coagulasi negativi, micrococchi, talora anche *Staphylococcus aureus*), corinebatteri, miceti lipofili e non. Presenza anche di anaerobi stretti, in particolare *Propionibacterium acnes*.
- 2) **Apparato respiratorio:** i distretti di norma sterili sono la laringe, la trachea, i bronchi e gli alveoli polmonari. I distretti non sterili sono:
 - A) Cavità orale, l'orofaringe ed il rinofaringe nella quale si ritrovano molte specie diverse di stafilococchi e di streptococchi alfa e non emolitici, *Neisseriae*, emofili, actinomiceti, *Candida* prevalentemente della specie *albicans*, enterobatteri.
 - B) Fosse nasali: varie specie di stafilococchi e streptococchi, *Neisseriae*, emofili, corinebatteri.
- 3) **Apparato gastro-enterico:** i distretti sterili sono di norma l'esofago, lo stomaco, la maggior parte dell'intestino tenue, il peritoneo. I distretti non sterili sono:
 - A) Cavità orale.
 - B) Intestino crasso e parte terminale dell'ileo, in cui dominano i germi anaerobi, quali *Bacteroides*, *Prevotella*, fusobatteri, clostridi, lattobacilli, eubatteri, cocchi gram positivi. Tra gli anaerobi facoltativi troviamo gli enterobatteri, varie specie di stafilococchi e streptococchi, enterococchi. Sono presenti anche i miceti con varie specie di lieviti e bastoncelli Gram negativi non fermentanti, quali *Pseudomonas* ed *Alcaligenes*.
- 4) **Apparato genitale ed urinario:** i distretti sterili sono di norma tutti gli organi interni quali gli organi riproduttivi maschili e femminili, la vescica gli ureteri ed i reni. I distretti non sterili sono:
 - A) Genitali esterni maschili e femminili, in cui sono presenti varie specie di stafilococchi e streptococchi, cocchi anaerobi, anaerobi stretti quali *Mobiluncus* e *Bacteroides*, corinebatteri, talora enterobatteri. Nella vagina la flora batterica varia considerevolmente secondo l'età del soggetto: è simile a quella cutanea nella pre-pubertà e nella menopausa, è costituita prevalentemente da varie specie di lattobacilli durante l'età fertile, con presenza di batteri indicati per i genitali esterni e talora *Gardnerella*.
 - B) Uretra: con gli stessi germi di cui sopra e con presenza di micoplasmici.

Metodi di prelievo, raccolta, trasporto e conservazione dei campioni biologici

Indicazioni generali

Per garantire il migliore risultato possibile ad un'indagine batteriologica (colturale e/o batterioscopica) è fondamentale eseguire in maniera corretta non solo il prelievo, conoscendo bene dove, come e quando prelevare, ma anche tutte le successive fasi, fino all'arrivo del campione nel laboratorio di Microbiologia.

È opportuno dunque che il personale sanitario addetto al prelievo del campione sia informato delle modalità corrette con cui eseguire i vari passaggi e la cosa migliore e quella di proporre tutte queste procedure in un piccolo manuale di facile consultazione, da inviare ai singoli reparti per ogni necessità ed a cui fare riferimento in caso di dubbi o di verifica delle procedure.

Un'attenzione particolare deve essere posta anche nella preparazione del paziente collaborante informandolo delle caratteristiche del prelievo e delle sue finalità cliniche; inoltre il personale sanitario che esegue il prelievo deve rispettare, quando possibile, le seguenti regole:

- 1) sospendere qualsiasi tipo di terapia antibiotica prima del prelievo (almeno 48 ore) o, meglio, eseguirlo prima di iniziartela
- 2) eseguire il prelievo del materiale nella sede dell'infezione facendo attenzione alla contaminazione da germi endogeni o esogeni
- 3) fare il prelievo nel momento più opportuno per ritrovare i batteri patogeni che causano quella particolare malattia infettiva
- 4) prelevare una quantità adeguata di campione per eseguire tutte le indagini richieste
- 5) attenersi scrupolosamente alle modalità di trasporto e conservazione del materiale biologico prelevato in considerazione del batterio ricercato.

Infezioni respiratorie: alte vie

Tampone faringeo

Eseguire il prelievo utilizzando un'abbassa lingua o una garza sterile con cui tenere ferma la punta della lingua. Estrarre il tampone sterile dal contenitore in plastica e toccare con una certa pressione sulle zone del faringe arrossate, ulcerate o con placche facendo attenzione a non toccare le guance, la lingua, le labbra. Riporre il tampone nel contenitore sterile contenente il terreno di trasporto ed inviare in laboratorio.

La ricerca è di norma finalizzata alla ricerca di streptococchi β -emolitici ed in particolare di *Streptococcus pyogenes*. In caso di indagini particolari (miceti, bacillo difterico, *Arcanobacterium haemolyticum*, angina di Vincent, altri eventuali patogeni quali *Neisseria gonorrhoeae*, o ricerca di portatori di *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*) pretendere una richiesta specifica da parte del medico richiedente per fare la coltura dei batteri negli opportuni terreni di crescita o eseguire indagini specifiche.

Tampone nasale

Si esegue di norma per la ricerca dei portatori sani di *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) e per pazienti che devono sottoporsi ad interventi chirurgici ad alto rischio d'infezione (esempio cardiocirurgia). Può talora essere richiesto anche in caso di sinusiti con abbondante presenza di muco purulento per la ricerca di altri patogeni respiratori quali, emofili, pneumococco, *Moraxella*, di cui, peraltro, non è sempre chiaro il significato del loro reperto come indice predittivo certo della sinusite. In altri casi di sinusite questo tipo di prelievo non è indicato ed il risultato colturale può talora fuorviare il giudizio del medico curante.

Tampone naso-faringeo

In caso di sospetta difterite può essere eseguito un tampone naso-faringeo per la ricerca del batterio facendo anche in contemporanea un preparato batterioscopico dalle membrane biancastre con essudato formatesi nella gola o nel naso-faringe, che deve essere colorato con la colorazione di Albert.

Il tampone deve essere trasportato rapidamente in laboratorio.

La coltura si esegue seminando il tampone in terreno di Loeffler, su agar cistina-tellurito e su agar sangue. Questo prelievo viene eseguito anche per la ricerca della *Bordetella pertussis* impiegando un tampone montato su uno stelo di materiale flessibile per raggiungere bene il faringe.

Tampone orale

Si esegue solo per confermare una candidosi orale o per la conferma di angina di Vincent.

Tampone auricolare

Si esegue per individuare i microrganismi responsabili di un'otite esterna (in cui oltre a *P. aeruginosa* e *S. aureus* sono talora coinvolti anche miceti del genere *Aspergillus*) o di un'otite media, che presenta come maggiori responsabili *S. pneumoniae*, *M. catharralis* ed *H. influenzae*.

Prima di eseguire il prelievo è opportuno pulire preventivamente il condotto uditivo esterno con un tampone sterile inumidito con soluzione fisiologica sterile.

In caso di otite esterna prelevare con un tampone facendo una certa pressione sui bordi del canale; nelle otiti medie far eseguire il prelievo dal medico specialista che dovrà prelevare il materiale che fuoriesce dalla membrana timpanica. I germi in causa più frequentemente sono streptococchi, emofili, enterobatteri e batteri non fermentanti il glucosio.

Infezioni respiratorie: basse vie*Espettorato*

La raccolta e la coltura dell'espettorato è raccomandata solo in caso di polmonite con presenza di abbondanti secrezioni provenienti dalle basse vie respiratorie, o durante la riattivazione di bronchiti croniche.

Tuttavia, proprio a causa del passaggio di questo materiale in zone fortemente contaminate da una flora batterica residente, è necessario eseguire un esame batterioscopico per verificarne la provenienza profonda e quindi l' idoneità alla coltura.

Il materiale deve essere raccolto preferibilmente al mattino, evitando la commistione con la saliva, dopo pulizia del cavo orale con acqua distillata sterile ed invitando il paziente a fare atti inspiratori ed espiratori forzati per facilitare colpi di tosse profondi.

Il trasporto al laboratorio deve avvenire rapidamente, entro un' ora dalla raccolta, mentre può rimanere in frigorifero per circa tre ore.

Di norma si esegue la coltura per pneumococchi, emofili, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, Gram negativi. Altre indagini particolari (*Legionella*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydiae*) debbono essere chiaramente specificate nella richiesta.

In caso di ricerca di micobatteri è opportuno ripetere la ricerca su tre diversi campioni.

Lavaggio bronchiale

Il materiale è idoneo per la ricerca dei seguenti batteri: micobatteri, legionella, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus*.

Così come l' espettorato è un materiale poco affidabile per una conferma d' infezione delle basse vie respiratorie.

Lavaggio bronco-alveolare

Il materiale ottenuto è il migliore per ottenere una risposta affidabile di un' infezione delle vie profonde, ma deve essere eseguito da personale qualificato ed in situazioni cliniche ben definite.

La frazione alveolare è quella migliore in quanto meno contaminata da eventuale flora residente. Se si desidera una conta batterica quantitativa è necessario conoscere il volume di soluzione fisiologica impiegata per il prelievo del campione.

Lavaggio bronco-alveolare protetto

È la tecnica più sicura per ottenere un campione significativo del processo infettivo in caso di polmonite.

Liquido pleurico

La raccolta di questo liquido può essere importante per diagnosticare polmoniti in presenza di versamento pleurico. Il materiale viene raccolto con siringa ed inviato subito in laboratorio in idonei contenitori sterili. Si ricercano di norma: stafilococchi, streptococchi, Gram negativi, micobatteri, *Legionella*, *Nocardia*, germi anaerobi, miceti.

Infezioni dell' apparato urinario e genitale

Urinocoltura

La raccolta deve essere eseguita preferibilmente al mattino, essendo le urine rimaste in vescica per almeno quattro ore, previa accurata pulizia dei genitali esterni con acqua e sapone senza disinfettante.

La raccolta è, di norma, eseguita con la tecnica del “mitto intermedio”: il paziente deve scartare la prima parte dell’urina, trattenere la minzione per pochi secondi e raccogliere direttamente la seconda parte in un contenitore sterile a bocca larga, con tappo a vite. L’urina, se non è inviata rapidamente in laboratorio deve essere posta in frigorifero per un massimo di 24 ore: se si esegue la raccolta impiegando acido boricco come conservante si può attendere fino a 24 ore a temperatura ambiente, ma bisogna ricordare che ci possono essere interferenze se si usano alcuni sistemi automatici per lo screening della batteriuria.

In condizioni particolari possono essere ottenuti campioni d’urina raccolti con altre tecniche, quali sacchetto di plastica sterile per neonati, catetere temporaneo o a permanenza.

Particolare attenzione deve essere posta sulle modalità di prelievo, conservazione e trasporto del campione per evitare sovrastime della carica batterica o indicare false positività.

Si ricercano di norma enterobatteri, batteri non fermentanti, stafilococchi, enterococchi, mentre altre indagini particolari (*Legionella*, micoplasmi, *Chlamydia trachomatis*) debbono essere chiaramente specificate nella richiesta.

Tampone uretrale

Questo esame è richiesto in caso di uretrite sia nell’uomo sia nella donna.

Nell’uomo non è indicato per diagnosticare una prostatite.

Si ricercano di norma come possibili patogeni i seguenti batteri: gonococco, micoplasmi, *Chlamydia trachomatis*.

È consigliabile associare sempre alla coltura un esame batterioscopico da sottoporre alla colorazione di Gram.

La ricerca della clamidia può essere fatta con varie metodiche: Elisa, immunofluorescenza diretta, PCR, ma con quest’ultima tecnica di biologia molecolare e, soprattutto per i soggetti di sesso femminile, il materiale su cui eseguire l’indagine può essere la prima parte dell’urina emessa preferibilmente al mattino non avendo in precedenza urinato da almeno tre ore.

Tampone vaginale

L’indagine è eseguita per diagnosticare un’infezione a livello vaginale di cui sono responsabili microrganismi differenti a secondo dell’età della donna, proprio perché varia con l’età la produzione di ormoni sessuali che esercitano un’attività diretta a carico dell’epitelio vaginale e quindi anche della flora in esso residente. Il prelievo deve essere eseguito da personale sanitario esperto prelevando il campione dal fornice posteriore con l’uso dello speculum per rendere visibile la zona.

In età prepubere, come in menopausa avanzata, non sono presenti i lattobacilli che invece abbondano sotto lo stimolo degli estrogeni in età fertile: i lattobacilli sono i colonizzatori della mucosa vaginale proteggendola da altri microrganismi anche patogeni.

Di norma l’esame è finalizzato alla ricerca dei lattobacilli che, se presenti in abbondanza, confermano lo stato di salute dell’epitelio vaginale.

È opportuno richiedere, in contemporanea all'esame colturale, anche uno striscio batterioscopico sia per valutare, "in vivo", la situazione microbica e cellulare, sia perché alcuni ceppi di lattobacilli non crescono se non incubati in anaerobiosi stretta e quindi la loro assenza in coltura potrebbe fuorviare la diagnosi; inoltre possiamo avere un'immagine diretta della flora batterica tipica in presenza della *Gardnerella vaginalis* insieme alle "clue cells" [►► FOTO] e di un'eventuale flora anaerobia con o senza *Mobiluncus*.

In età fertile i patogeni causa di vaginite sono la *Candida* (*albicans* o di altre specie), e talora il *Trichomonas vaginalis*, mentre la presenza di enterobatteri, streptococchi, *Streptococcus agalactiae* e stafilococchi deve essere attentamente valutata prima di considerarla patogena nel caso specifico: si prenderà in considerazione la carica batterica e l'assenza di altri batteri (in particolare l'assenza o la forte riduzione dei lattobacilli).

In caso di vaginosi la ricerca deve essere indirizzata verso *Gardnerella vaginalis*, che è spesso accompagnata da una flora anaerobia (*Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, streptococchi anaerobi) e da micoplasmi, a dimostrazione della situazione di dismicrobismo venutasi a creare in vagina.

In età prepubere si ricercano di solito *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* ed altre specie di *Candida*, emofili, *Staphylococcus aureus* ed enterobatteri.

In menopausa prevalgono invece gli enterobatteri talora presenti in cariche elevate.

In gravidanza è ormai diffusa in molti ospedali la ricerca, di norma alla 35^a-36^a settimana di gestazione o immediatamente prima del parto, dello *Streptococcus agalactiae*, per prevenire una sua possibile trasmissione al feto al momento del parto. Questo batterio, sebbene spesso presente in vagina come semplice saprofita, può comunque in alcuni casi essere il vero responsabile di vaginiti o vulviti con sintomatologia clinica evidente (bruciori, dolori, leucorrea).

Tampone cervicale

La cervice uterina è la sede dove deve essere eseguita la ricerca della *Chlamydia trachomatis* e della *Neisseria gonorrhoeae*. Possono essere ricercati anche i micoplasmi: *Mycoplasma hominis* ed *Ureaplasma urealyticum* di cui è opportuno valutare la carica batterica.

Liquido prostatico

In caso di prostatite acuta i germi responsabili sono di norma quelli agenti anche d'infezioni urinarie.

In caso di prostatite cronica i germi più spesso in causa sono l'*Escherichia coli*, e l'*Enterococcus faecalis*, ma quando non si isolano batteri, l'agente eziologico può risultare in casi rari e difficilmente documentabili, la *Chlamydia trachomatis*; di solito, per individuare la sede dell'infezione, viene richiesto il test di Meares e Stamey che prevede una ricerca colturale quantitativa sulla prima parte, "primo mitto" delle urine (espressione dei batteri presenti nell'uretra ed in vescica), sulle urine a metà minzione o "mitto intermedio", (espressione dei batteri presenti in vescica), sulla secrezione prostatica raccolta con massaggio (espressione dei batteri presenti nella prostata e nelle residue urine vescicali) e sulle urine raccolte dopo massaggio prostatico (espressione dei batteri presenti nelle urine e quelli residui presenti nella prostata). L'interpretazione dei

risultati deve essere fatta in base ai risultati ottenuti nei vari prelievi ed alla relativa carica batterica ottenuta, considerando l'infezione prostatica solo se si isolano batteri significativi e con cariche più alte nel campione ottenuto dopo massaggio prostatico.

Liquido seminale

L'esame colturale prevede la ricerca di batteri noti come possibili agenti eziologici di prostatite (enterobatteri ed enterococco come più frequenti, piociano, stafilococchi, streptococchi, come cause meno frequenti). Inoltre occorre ricordare che il materiale può essere contaminato dalla flora batterica residente nell'uretra. È richiesto dal medico curante al posto del secreto prostatico in quanto più facilmente ottenibile, ma presenta l'inconveniente di contenere appunto anche questo materiale, risultando più diluito e non permettendo di riconoscere la provenienza dei batteri.

L'esame colturale si esegue anche nell'ambito di uno screening per la diagnosi d'infertilità o per una fecondazione assistita, assicurandoci dell'assenza di batteri potenzialmente patogeni, tra i quali i più frequenti sono i ceppi Gram negativi.

Pur con le suddette limitazioni in questo materiale si può ricercare anche la *Chlamydia trachomatis*, ma è preferibile eseguirla sul primo mitto delle urine prima di raccogliere il liquido seminale.

Secrezione balano prepuziale

I germi in causa sono prevalentemente cocchi Gram positivi e *Candida albicans*.

Infezioni dell'apparato digerente

La gamma di batteri responsabili di infezioni gastro-enteriche è ampia e molto diversificata comprendendo germi Gram positivi, Gram negativi ed anaerobi ed è aumentata notevolmente in questi ultimi anni, anche a causa della maggiore attenzione al problema e ad un miglioramento delle tecniche diagnostiche.

È necessario quindi conoscere dal medico richiedente le indagini da eseguire perché non è proponibile, sia per i costi sia per l'aggravio di lavoro, una ricerca di tutti i possibili patogeni batterici su ogni campione di feci.

Nei pazienti ambulatoriali è di norma prevista la ricerca di *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*, mentre nei pazienti ricoverati che presentano gastroenterite si deve ricercare il *Clostridium difficile*, causa talora di piccoli episodi epidemici.

Un aspetto particolare rivestono le tossinfezioni alimentari: questi casi debbono essere segnalati dal medico richiedente ed il laboratorio eseguirà una ricerca allargata ai batteri responsabili di questa patologia, mentre la ricerca della tossina nell'alimento sospetto è delegata al laboratorio dell'Agenzia regionale per la prevenzione.

È opportuno ricordare che un'infezione in questa sede può essere provocata anche da virus (in particolare *Rotavirus*) o da parassiti (in particolare *Giardia lamblia*) e quindi, per una diagnosi di laboratorio completa, non è sufficiente limitarsi alla ricerca dei batteri.

Materiali provenienti da siti di norma sterili

La crescita di microrganismi a seguito della coltura di materiali provenienti da siti di norma sterili deve essere sempre considerata significativa e quindi deve essere eseguita l'identificazione e l'antibiogramma. Pertanto il prelievo deve essere fatto con particolare attenzione prevenendo possibili contaminazioni esterne che potrebbero falsare il risultato colturale.

Particolare rilievo assumono le emocolture per una diagnosi di setticemia e la coltura del *liquor* cefalo-rachidiano per la conferma di una meningite batterica: in quest'ultimo caso il *liquor* deve essere trasportato subito in laboratorio non refrigerato, per impedire la morte di alcuni batteri particolarmente fragili come il meningococco e l'emofilo.

Come regola generale è opportuno, qualora possibile, prelevare il materiale con siringa o, solo se il materiale è scarso, con tampone inviandolo inserito nel terreno di trasporto.

In presenza di quantità abbondanti di materiali può essere utile seminarne una parte direttamente nei tubi per l'emocoltura, in particolare se il prelievo è eseguito in ore di chiusura del laboratorio di Microbiologia.

Qualora si desideri ricercare germi particolari (es. anaerobi, miceti, legionelle, micobatteri, ecc.) è necessario indicarlo sulla scheda di richiesta al laboratorio di Microbiologia.

La ricerca di germi anaerobi deve essere eseguita il più rapidamente possibile impiegando kit di prelievo particolari ed evitando la presenza dell'ossigeno nel contenitore.

In tutti i casi, qualora possibile, è opportuno preparare anche un esame batterioscopico da colorare con la colorazione di Gram o con quella per i micobatteri.

Cateteri vascolari

Spesso i cateteri vascolari risultano contaminati dalla flora batterica cutanea residente nella zona d'inserzione e, da quella sede, i batteri possono progredire e contaminare la porzione inserita del catetere, determinando anche un'infezione sistemica.

I germi di norma in causa sono prevalentemente stafilococchi, streptococchi, difteroidi, ma talora anche enterobatteri e miceti del genere *Candida*.

Nel caso in cui il paziente presenti una batteriemia continua o esista il sospetto di un'infezione associata al catetere è opportuno eseguire in contemporanea un'emocoltura da una vena periferica ed un'altra direttamente dal catetere e valutare in maniera quantitativa la carica batterica che, se maggiore di 5 volte quella riscontrata da vena periferica, indica l'infezione derivante dal catetere ed impone una sua rapida rimozione e sostituzione.

Liquidi di drenaggio

Questi liquidi insieme ad altri provenienti da cavità di norma sterili (pericardico, ascitico, peritoneale, articolare, sinoviale, bile) possono dare indicazioni valide se prelevati da cavità chiuse con siringa sterile, mentre se prelevati da tubi di drenaggio possono essere espressione di una colonizzazione batterica più che di vera infezione.

La ricerca è di solito finalizzata ai germi comuni e, talora, agli anaerobi, mentre altre indagini particolari (miceti filamentosi o micobatteri) devono essere specificate.

Ulcera da decubito, piaghe, ustioni

A causa della possibile colonizzazione o contaminazione da parte di una flora endogena o esogena non è sempre agevole individuare il vero responsabile del processo infettivo. Particolare attenzione deve essere posta nel prelievo del campione evitando l'uso di tamponi, ma impiegando tecniche particolari concordate con il reparto in modo da ottenere un materiale rappresentativo del quadro morboso.

Ascessi

Prima corretta pulizia e disinfezione della sede prelevare un certo quantitativo di materiale purulento con siringa sterile trasferendolo subito in idoneo contenitore utile anche per la ricerca di germi anaerobi (contenitori con atmosfera priva di ossigeno o terreni di trasporto adeguati). Se possibile eseguire sempre anche uno striscio batterioscopico da colorare al Gram per conoscere direttamente il tipo di flora batterica presente in sede ed avere indicazioni per interpretare correttamente l'esame colturale.

L'indagine è finalizzata alla ricerca di germi comuni (in particolare stafilococchi e streptococchi), di miceti e di anaerobi.

Essudato congiuntivale

Prelevare il campione da entrambi gli occhi prima della somministrazione, anche locale, di antibiotici ed anestetici: l'interpretazione delle due colture ci permetterà di valutare meglio la presenza di germi contaminanti.

Si ricercano di norma germi comuni. In caso di ricerca della *Chlamydia trachomatis* impiegare un apposito sistema di raccolta.

Emocoltura

È necessaria la massima attenzione alla fase del prelievo dei campioni per ridurre al minimo le contaminazioni esterne.

Si ricercano di norma germi aerobi, anaerobi e miceti. In caso di sospetta endocardite o brucellosi le colture devono essere prolungate fino a tre settimane.

Liquor cefalo rachidiano

Porre particolare attenzione alla fase del prelievo: il liquor, subito dopo la raccolta, deve essere trasferito in provette sterili ed inviato in laboratorio. È opportuno allestire sempre uno striscio batterioscopico in caso di liquor torbido o anche leggermente opalescente, per osservare in tempi rapidi l'eventuale presenza di microrganismi e segnalarli tempestivamente al curante. In casi particolari il liquor può mostrarsi limpido anche in presenza di un'infezione batterica nella fase precoce, quando non è ancora comparsa la reazione dell'ospite, oppure in soggetti con scarsa reattività immunologica o quando il microrganismo in causa è il criptococco.

Per tali motivi è sempre opportuno eseguire anche la ricerca degli antigeni solubili.

Valutazione del campione biologico per l'esame colturale

Prima di processare il campione arrivato in laboratorio è necessario accertarne la qualità, la quantità e la corretta raccolta (impiego di idonei contenitori, provette, terreni di trasporto).

Deve essere inoltre eseguito un controllo diretto del campione inviato per verificarne le conformità e, nel caso si riscontrino non concordanze, deve essere definito un accordo con i reparti per decidere se rifiutare immediatamente il campione o se accettarlo comunque ma dopo aver avuto assicurazioni da chi ha fatto materialmente il prelievo.

Riportiamo qui di seguito un elenco delle più comuni non conformità in batteriologia:

- Quantità del campione insufficiente
- Prelievo errato
- Contenitore non idoneo
- Contenitore sporcato all'esterno
- Tamponi con terreno di trasporto scaduto
- Tamponi con terreno di trasporto secco
- Richiesta di coltura per anaerobi con materiale non idoneo
- Richiesta di coltura per anaerobi con prelievo e/o trasporto non corretto
- Eccessivo ritardo nell'invio del campione in laboratorio
- Errore nella compilazione della scheda
- Mancanza delle etichette con numero giornaliero identificativo del paziente
- Errore nel mettere le etichette sui contenitori
- Etichette messe sopra il codice a barre delle emocolture
- Mancanza dello specifico codice esame sulla richiesta
- Non congruenza della richiesta con quanto indicato sul contenitore del campione
- Non indicazione sul contenitore della tipologia del materiale

È opportuno disporre anche d'informazioni utili, quali il tempo del prelievo, la temperatura di conservazione del campione, l'impiego o meno di una terapia antibiotica, perché sono elementi importanti per valutare la validità analitica del campione o comunque per interpretare correttamente i risultati degli esami eseguiti.

Capitolo II

Le tecniche batteriologiche

La colorazione di Gram

Come già accennato questa colorazione è stata la pietra miliare della batteriologia ed ancora oggi non ha perso importanza rispetto ad altre tecniche e resta un ottimo sistema di diagnosi rapida per la sua velocità d'esecuzione e, fatto non trascurabile, anche per i costi molto contenuti.

Il metodo presenta però un limite importante che è legato alla incapacità di evidenziare una carica batterica inferiore a 10.000-100.000 ufc/ml nel campione biologico.

Il materiale biologico deve essere strisciato su un vetrino portaoggetti ben pulito e sgrassato, lasciato asciugare a temperatura ambiente o in termostato e poi fissato alla fiamma.

La colorazione può essere eseguita partendo dalle polveri dei coloranti e preparandone le soluzioni madri, da cui allestire le soluzioni di lavoro, ma da anni esistono comodi kit commerciali già pronti all'uso che danno risultati sovrapponibili alla metodica tradizionale.

Seppure molto semplice nell'esecuzione questa colorazione merita una particolare attenzione al momento della decolorazione, dopo il passaggio del colorante di cristalvioletto e il suo successivo fissaggio alla parete cellulare con la soluzione iodio-iodurata.

Infatti se si insiste anche un poco di più con il decolorante si rischia di far diventare Gram negativi anche germi che non lo sono quali, in modo particolare, gli streptococchi, ma anche i lattobacilli ed i bacilli Gram positivi in genere.

Nella foto a) sono presenti numerosi difteroidi e nella foto b) numerosi lattobacilli, entrambi troppo decolorati in quanto appaiono in rosso anziché in blu [► FOTO].

I metodi culturali

La conferma di un'infezione batterica sospettata clinicamente avviene con l'impiego di metodi culturali, che permettono l'isolamento dell'agente patogeno e, successivamente, la verifica della sua sensibilità (o resistenza) agli antibiotici impiegati in terapia.

In questi ultimi anni sono stati proposti anche metodi alternativi rapidi (immuno-enzimatici, immunocromatografici o con sonde genetiche), che abbinano alla velocità d'esecuzione anche un'elevata sensibilità e specificità, sebbene con costi talora alti.

Tuttavia l'esame culturale tradizionale, anche in tempi in cui si parla di un impiego sempre più spinto in microbiologia delle tecniche di biologia molecolare, rimane un

punto cardine della batteriologia clinica perché ci permette di lavorare direttamente sul batterio causa dell'infezione e quindi di verificarne tutte le sue caratteristiche di specie.

In tal modo siamo in grado di studiarne l'epidemiologia, di verificarne nel tempo eventuali variazioni di sensibilità agli antibiotici impiegati in terapia e di riconoscere eventuali modifiche del fenotipo che spesso si accompagnano a variazioni del genotipo.

Dobbiamo quindi isolare il ceppo dal materiale patologico del paziente impiegando le tecniche migliori e più collaudate per aumentare al massimo la percentuale di successo della ricerca.

Un momento importante risulta allora la scelta dei terreni di coltura più idonei alla specifica indagine, ricorrendo anche all'aggiunta di particolari sostanze selettive o differenziali per facilitare l'isolamento del patogeno ricercato, ma particolare attenzione deve essere posta al rispetto dei tempi e delle modalità d'incubazione.

Una volta ottenuta la crescita del ceppo batterico dobbiamo essere assolutamente certi di averlo isolato in coltura pura per sottoporlo all'identificazione di specie usando sistemi biochimici e, se necessario, con prove sierologiche di conferma.

Questo passaggio è il punto più importante di tutto il percorso ed è da qui in poi che avranno un senso reale tutte le implicazioni pratiche che deriveranno dallo studio del microrganismo.

Cercheremo dunque di dare delle indicazioni operative per i singoli materiali che dovremo mettere in coltura nonché per i batteri più frequentemente causa di malattie in quel distretto corporeo. Non abbiamo certo la pretesa di dare suggerimenti assoluti, vista anche la varietà dei terreni colturali disponibili in commercio, sia come piastre pronte sia come polveri da preparare in casa, ma presenteremo quelle metodiche che si sono dimostrate valide nel tempo nella nostra quotidiana esperienza.

Tecniche per la semina in piastra

La semina dei campioni biologici deve essere eseguita con cura, con l'intenzione di ottenere colonie isolate su cui fare le indagini necessarie, quali identificazione batterica ed antibiogramma.

Il campione viene prelevato con un'ansa calibrata monouso in plastica sterile da 1 o da 10 μ l: se si tratta di un campione liquido (urina, liquor, ecc.) il materiale deve essere preventivamente ben mescolato, mentre se si tratta di materiale solido (pus, espettorato, feci, ecc.) può essere prelevato con un tampone sterile o con l'ansa nelle parti più significative del campione, oppure può essere diluito ed omogenato (ad esempio l'espettorato viscoso) con idonei apparecchi tipo Stomacher®.

La tecnica impiegata per la semina può essere quella dei "quattro quadranti" che ci permette di ottenere colonie isolate ed apprezzare la carica batterica originaria del campione in maniera semiquantitativa: seminare il primo quadrante, gettare l'ansa, prenderne una nuova, riprendere la semina dall'ultima strisciata ruotando la piastra di 90°, seminare il quadrante, ruotare di nuovo di 90° seminare il quadrante e ripetere

l'operazione per l'ultimo quadrante. Valutare la crescita batterica in relazione al numero dei quadranti in cui avviene: se la crescita è evidente anche nell'ultimo quadrante la carica batterica sarà superiore ad 1 milione di ufc/ml.

Se desideriamo avere una conta più precisa si striscia il materiale con una linea retta nel centro della piastra e poi con un'ansa nuova seminando ad incrocio da una parte all'altra della piastra, senza ripassare sui punti già seminati.

La carica batterica, espressa in numero di unità formanti colonie per millilitro (ufc/ml), è data dal numero delle colonie contate in piastra moltiplicate per il fattore di diluizione che, se abbiamo usato l'ansa da 1 μ l sarà 1000, oppure 100 se abbiamo usato l'ansa da 10 μ l [►► FOTO].

Quando si seminano campioni biologici di soggetti in terapia antibiotica può succedere che il farmaco abbia solo un'azione batteriostatica e non battericida per cui diluendo con l'ansa il campione sulla piastra si diluisce anche l'antibiotico fino ad una concentrazione tale da far riprendere la crescita batterica che pertanto si evidenzia solo nell'ultima parte della semina e non nella parte iniziale della stessa.

Le foto seguenti sono state ottenute dopo la semina di un campione di liquido peritoneale di un soggetto in terapia antibiotica, confermata con la forte positività del PAR test (ricerca del potere antibiotico residuo) sul liquido biologico. In questo caso il ceppo cresciuto era una *Escherichia coli* [►► FOTO].

Capitolo III

Coltura dei materiali biologici

Emocoltura

Questa ricerca rappresenta una delle tappe più importanti dell'indagine batteriologica perché riveste un significato clinico rilevante ai fini dell'aspettativa di vita del paziente.

Le setticemie risultano infatti fra le principali cause di morte ed è quindi fondamentale eseguire al meglio questa indagine e, soprattutto, ottenere un isolamento del possibile patogeno entro il più breve tempo possibile: il medico avrà allora le armi per contrastare l'infezione conoscendone l'agente causale e la sua sensibilità agli antibiotici.

È opportuno che siano concordate con i reparti le modalità corrette di prelievo dei campioni, la quantità del sangue prelevato, i tempi ed il numero dei prelievi da eseguire, le modalità di conservazione in caso di chiusura del laboratorio, riportando tutte queste informazioni in un opuscolo a disposizione del personale sanitario che eseguirà materialmente il prelievo.

Il prelievo deve essere eseguito, di norma, prima della terapia con antibiotici perché questi ultimi possono interferire con la crescita batterica e rendere talora falsamente negativo un esame colturale: in caso di necessità, se non è possibile sospendere la terapia, è opportuno prelevare il campione di sangue immediatamente prima della successiva somministrazione dell'antibiotico in modo da averne in circolo la minore quantità possibile.

Per l'esame sono impiegati particolari flaconi contenenti un brodo arricchito che sono forniti direttamente dalla farmacia dell'Ospedale o dal laboratorio ed a cui debbono essere riconsegnati quanto prima dopo il prelievo per inserirli in apparecchiature apposite per il riconoscimento della crescita batterica.

In caso di segnalata positività del flacone si esegue una subcoltura su terreni che debbono garantire la crescita del germe causa dell'infezione e, siccome i possibili patogeni comprendono anche microrganismi particolarmente esigenti sotto il profilo nutrizionale, è fondamentale impiegare anche terreni arricchiti con sangue o sangue cotto addizionati di fattori di crescita.

In caso di sospetta brucellosi o di endocardite infettiva è opportuno incubare i terreni di coltura liquidi per almeno quattro settimane prima di considerarli negativi.

Deve essere inoltre ricordato che, sebbene in percentuali modeste, possono essere isolati anche anaerobi stretti e quindi può essere opportuno impiegare anche terreni idonei per la loro crescita ed il loro isolamento selettivo incubando in atmosfera anaerobia, così come per i batteri microaerofili (*Campylobacter* ed altri) incubando in atmosfera con CO₂. Bisogna prevedere anche l'impiego di terreni idonei per la crescita di miceti, di norma del genere *Candida*.

I terreni più comunemente impiegati per i batteri anaerobi facoltativi sono:

- 1) Agar Columbia addizionato di sangue di montone
- 2) Agar cioccolato con Isovitalex (per la crescita degli emofili)
- 3) Agar sale mannite (isolamento selettivo degli stafilococchi)
- 4) Agar MacConkey (isolamento selettivo degli enterobatteri)
- 5) Agar Columbia CNA, con o senza aggiunta di cristalvioletto (isolamento selettivo degli streptococchi)

Invece per i batteri anaerobi obbligati sono consigliati i seguenti:

- 1) Agar Schaedler
- 2) Agar Schaedler addizionato di Kanamicina+Vancomicina
- 3) Agar Columbia CNA o Agar feniletilico (PEA) (isolamento selettivo dei Gram positivi).

Per la coltura di brucelle è consigliato:

- 1) Agar triptosio o
- 2) Agar Brucella o
- 3) Agar BHI

Oltre ai germi comuni l'indagine può essere richiesta per ricercare nel sangue i micobatteri: in questo caso debbono essere impiegati terreni idonei alla loro crescita che prevede tempi più lunghi (fino a 60 giorni o comunque fino alla crescita del ceppo). In questo caso si usano modalità di coltura diverse e la positività dell'esame deve sempre far pensare ad un ruolo patogeno dell'isolato perché di norma i micobatteri non colonizzano la pelle.

La crescita di batteri che, di norma, sono considerati come contaminanti esterni pone talora seri problemi interpretativi perché, pur se raramente, possono invece essere i veri responsabili dell'infezione del paziente.

In questo caso il laboratorista deve far ricorso ad i seguenti criteri interpretativi:

- a) Se sono isolati batteri che normalmente colonizzano la cute (stafilococchi coagulasi negativi, difteroidi, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* spp.) si può supporre un loro ruolo patogeno solo se l'isolamento si ripete da più campioni, oppure se il paziente presenta protesi vascolari, specie se inserite da più giorni o se si trova in precarie condizioni immunitarie;
- b) Se si isolano ceppi di stafilococchi coagulasi negativi da pazienti sottoposti ad inserimento di protesi o dopo interventi chirurgici è possibile un loro coinvolgimento nell'episodio infettivo, dovuto a contaminazione esterna della sede dell'operazione durante l'intervento chirurgico;
- c) Se il paziente presenta cateteri vascolari inseriti è opportuno eseguire il prelievo di un campione di sangue direttamente dal catetere ed uno da un'altra vena periferica ed eseguire la conta delle colonie per stabilire la possibile sorgente della batteriemia;
- d) Se si isolano ceppi di streptococchi alfa emolitici si può attribuire loro un ruolo patogeno se esiste un sospetto di endocardite o di malattie a carico dell'intestino (ad esempio isolamento di *Streptococcus bovis*).

Da alcuni anni, visto anche il notevole aumento nella richiesta dell'esame, sono disponibili sul mercato varie apparecchiature automatiche per gestire in modo ottimale le emocolture.

Si tratta di strumenti termostatati a 37 °C in cui sono collocati flaconi contenenti un terreno liquido particolarmente ricco in modo da permettere la crescita anche dei batteri più esigenti e, per alcuni modelli, contenenti sostanze che neutralizzano gli antibiotici eventualmente presenti nel sangue.

Di norma il sangue del paziente è trasferito dopo il prelievo in un flacone per germi aerobi ed in uno per anaerobi, in quantità variabile a secondo della metodica impiegata: le bottiglie sono inserite nella macchina che provvede a fare letture delle stesse a tempi prefissati, usando sistemi diversi (radiometrici, fluorometrici o colorimetrici), che permettono d'individuare l'eventuale crescita batterica segnalandola subito all'operatore. Il tecnico provvederà a preparare uno striscio batterioscopico da colorare con il Gram ed a fare una subcoltura sui terreni più idonei per il batterio evidenziato. Al momento del prelievo è importante che il personale sanitario non disinfetti il tappo di gomma con iodofori o che non applichi sopra una garza con questo disinfettante perché rende permeabile all'aria la gomma e quindi modifica le condizioni dell'atmosfera del flacone.

Bisogna ricordare che, in caso di crescita di pneumococchi, questa è segnalata dallo strumento, ma se non si esegue rapidamente una subcoltura su piastra i batteri possono autolisarsi in breve tempo, muoiono e quindi non è possibile farli crescere. Allora, per conferma in caso sospetto, si possono ricercare gli antigeni specifici dello pneumococco con un test al lattice prelevando una quota del liquido del flacone, centrifugandolo ed eseguendo il test sul sopranatante.

Se l'esame microscopico dopo colorazione di Gram mette in evidenza un'unica specie batterica è possibile eseguire un antibiogramma diretto impiegando direttamente il brodo del flacone positivo oppure mettendo alcune gocce dello stesso in brodo Mueller-Hinton per 3-4 ore per ottenere una crescita di 0,5 McFarland da cui allestire le piastre con il metodo di Kirby-Bauer. In alternativa si può centrifugare la brodocoltura ed utilizzare il sedimento per l'antibiogramma: in questo caso non sarà possibile standardizzare l'inoculo, ma la lettura delle piastre potrà essere eseguita dopo 8 ore invece delle classiche 24.

In queste condizioni i risultati ottenuti sembrano sovrapponibili a quelli della tecnica classica che prevede l'antibiogramma solo dopo l'isolamento su piastra del ceppo.

Non appena è disponibile un dato preliminare (esame batterioscopico al Gram e/o esame colturale) è obbligatorio riferirne gli esiti quanto prima al medico curante per permettergli di iniziare una terapia antibiotica mirata sul ceppo segnalato.

È altrettanto importante indicare nel referto la possibilità che il ceppo isolato possa essere un contaminante e non il vero patogeno, applicando le regole indicate in precedenza.

Oltre ai metodi colturali tradizionali ed a quelli automatici è possibile impiegare anche un altro sistema: quello della lisi-centrifugazione (sistema ISOLATOR®) che permette l'immediata concentrazione dei batteri presenti nel campione in quanto il sedimento, dopo centrifugazione, è seminato in idonei terreni di coltura che possono risultare positivi dopo solo 24 ore.

La procedura è particolarmente valida in alcune situazioni cliniche, quali soggetti in terapia antibiotica, o per l'isolamento di micobatteri, miceti, ed altri batteri a lenta crescita, specie in soggetti immunodepressi.

Esame colturale del liquor cefalorachidiano

Le meningiti batteriche sono, insieme alle setticemie, i quadri clinici infettivi più gravi per l'uomo ed è necessario intervenire il prima possibile con una terapia antibiotica per cercare di salvare la vita al paziente.

A causa della fragilità di alcuni microrganismi (meningococco ed emofilo in particolare) è importante eseguire gli esami colturali subito dopo il prelievo del campione, ricordandosi di non mettere mai in frigorifero la provetta con il liquor prima dell'invio in laboratorio.

Oltre al metodo colturale, è opportuno eseguire anche dei test rapidi di coagulazione o al lattice, che mettono in evidenza gli antigeni solubili dei principali patogeni: pneumococco, emofilo, meningococco e, soprattutto per i neonati, lo *Streptococcus agalactiae*.

In caso di netta positività ad uno solo di questi antigeni la diagnosi di gruppo è sicura ma non infrequentemente si osservano reazioni deboli, come è possibile però osservare anche reazioni falsamente positive o negative.

Risulta quindi sempre obbligatorio eseguire sul sedimento del liquor dopo centrifugazione uno striscio da colorare al Gram, in cui, se presenti, si possono osservare i leucociti, prevalentemente neutrofilo ed i microrganismi in sede intra o extracellulare.

Tuttavia non sempre è possibile evidenziare i batteri nel sedimento colorato e nelle infezioni da *Listeria monocytogenes* o per la precoce somministrazione d'antibiotici, il numero dei microrganismi è di solito basso e quindi l'esame può risultare negativo.

Mentre il sovrantante potrà servire per studi biochimici, il resto del sedimento è impiegato per l'esame colturale che deve prevedere almeno i seguenti terreni, incubando in atmosfera con CO₂

- a) agar cioccolato con e senza bacitracina
- b) agar sangue Columbia

Se si sospetta una meningite causata da micobatteri parte del sedimento può essere colorata con la colorazione di Ziehl-Neelsen o con auramina-rodamina e parte sarà seminata su terreno di Lowenstein-Jensen, mentre se l'ipotesi è una meningite fungina la semina sarà eseguita su due piastre di Agar Sabouraud di cui una deve essere tenuta a temperatura ambiente ed una a 37 °C. In caso di presunta criptococcosi si esegue sempre anche un test a fresco con inchiostro di china [►► FOTO], mettendone una goccia su un vetrino portaoggetti insieme ad una goccia del sedimento del liquor e la positività del test è data dall'evidenza della capsula del criptococco che spicca chiaramente in bianco, come un anello di spessore variabile che circonda la cellula rotonda del micete.

Un test più sensibile per individuare il criptococco nel liquor è la ricerca dell'antigene specifico con la tecnica di agglutinazione su vetrino, ricordando che titoli > 1/8 sono considerati indici d'infezione recente.

Nei rari casi in cui si sospetti un'infezione da anaerobi la semina deve essere fatta su agar di Schaedler, incubando per 48 ore in anaerobiosi, ma mantenendo le piastre in coltura fino a 4 giorni.

È opportuno anche mettere un'aliquota del sedimento in una provetta di brodo al tioglicollato arricchito di vitamina K ed emina, da incubare per almeno 5 giorni.

Come nel caso dell'emocoltura i risultati dell'esame del liquor debbono essere immediatamente comunicati al medico curante, sia quelli dei test rapidi che quelli, non appena disponibili, della coltura e dell'antibiogramma per iniziare quanto prima una terapia mirata al germe responsabile.

Si ritiene utile eseguire insieme alla coltura del liquor anche quella del sangue.

La frequenza d'isolamento di certi batteri è spesso legata all'età del paziente: infatti nei neonati si isolano più facilmente *Streptococcus agalactiae* e *Listeria monocytogenes*, nei bambini fino a sei anni è predominante *Haemophilus influenzae*, mentre *Neisseria meningitidis* è più frequente tra i giovani e adulti e *Streptococcus pneumoniae* tra gli anziani.

Esame colturale di materiali respiratori

Basse vie respiratorie

Espettorato

È il materiale più frequentemente inviato in laboratorio ma presenta caratteristiche tali da renderlo spesso inutilizzabile alla ricerca richiesta: infatti l'espettorato è contaminato dalla flora batterica che colonizza le vie aeree superiori ed è pertanto necessario, prima di procedere alla coltura, verificarne l'idoneità per stabilire se si tratta di materiale proveniente veramente dalle basse vie respiratorie o se, invece, non sia costituito prevalentemente da saliva o cellule del cavo orale.

Pertanto, dopo una prima osservazione diretta sul materiale per scartare subito quei campioni con sola saliva, deve essere eseguito un esame batterioscopico da colorare al Gram per verificare il rapporto esistente tra cellule epiteliali squamose, tipiche della mucosa del cavo orale ed i leucociti, segno di una flogosi dell'albero respiratorio. In foto 1 osserviamo un campione significativo ad un ingrandimento di 100 ×, in foto 2 con ingrandimento di 250 ×, in foto 3 e 4 con ingrandimento di 1000 ×. In foto 3 si osservano alcuni polimorfonucleati e rare cellule epiteliali squamose ed in foto 4 numerose cellule mucipare della mucosa respiratoria, segno di un campione proveniente dalle basse vie, e quindi idoneo per l'esame colturale [►► FOTO].

Nell'allestimento del preparato si deve avere l'accortezza di prelevare con l'ansa le parti più significative del campione (muco, sangue) da strisciare sul vetrino.

Per valutare la qualità del campione si osserva il preparato prima a piccolo ingrandimento, per avere una visione d'insieme e poi, ad ingrandimento maggiore, si contano i leucociti e le cellule epiteliali per campo microscopico: come criterio interpretativo si può usare lo schema proposto da Bartlett, secondo il quale debbono essere considerati contaminati tutti quei campioni che presentano, per campo microscopico a 100 ×, un numero di cellule squamose >25 ed un numero di leucociti compresi tra 1 e 25, facendo una media di più campi microscopici.

In figura 5 si osserva un materiale con numerose cellule epiteliali squamose a piccolo ingrandimento (100 ×), in figura 6 ad ingrandimento maggiore (250 ×) ed in figura 7 una

cellula squamosa a 1000 ×. In figura 8 osserviamo cellule squamose e blastospore di *Candida*, indice di contaminazione del campione con flora colonizzante del cavo orale [► FOTO].

Se il campione risulta idoneo debbono essere identificati i batteri presenti per una diagnosi presunta se il batterio è predominante (circa 10 batteri a 1000 ×) in più campi microscopici: in tal caso è opportuno informare il medico del reparto, anche se non sempre queste osservazioni coincidono con l'esito dell'esame colturale.

La coltura è eseguita per individuare il batterio responsabile del quadro infettivo ma la certezza di una sua responsabilità diretta nella patologia si può ottenere solo con l'impiego di tecniche invasive (e pertanto difficilmente impiegabili) che superano il problema dei germi colonizzanti.

La coltura dell'espettorato dovrà limitarsi alla ricerca dei patogeni più comuni (pneumococco, emofilo, *Staphylococcus aureus*, enterobatteri e Gram negativi non fermentanti il glucosio, *Moraxella catarrhalis*) che saranno presi in considerazione per una conferma di specie e per l'antibiogramma solo se in carica prevalente dopo una semina semiquantitativa in piastra con la tecnica dei quattro quadranti, e cioè quando il ceppo presenta un grado di crescita di almeno 5 colonie nel terzo quadrante o anche nel quarto. In caso si sospetti un'infezione da micobatteri si deve eseguire una procedura particolare che è descritta in dettaglio nel capitolo a loro dedicato.

Di norma non si devono eseguire esami aggiuntivi se la coltura mette in evidenza solo una flora batterica residente del cavo orale (stafilococchi non aurei, streptococchi alfa o non emolitici e neisserie saprofiti), anche se in carica elevata.

I terreni impiegati di norma sono:

- a) agar sangue Columbia
- b) agar cioccolato con bacitracina
- c) agar sale mannite
- d) agar MacConkey

Altri terreni possono essere aggiunti anche sulle indicazioni ottenute dall'esame batterioscopico.

Sistema di valutazione di Bartlett:

Neutrofilo per campo (lettura a 100 ×)	Qualità campione
< 10	0
10-25	+1
> 25	+2
Presenza muco	+1
Cellule epiteliali per campo (100 ×)	
10-25	-1
> 25	-2

Si calcola il numero medio degli elementi suddetti in 20-30 differenti campi microscopici ed il punteggio finale si ottiene facendo la somma algebrica dei punteggi indicati: se uguale o inferiore a 0 il campione non è idoneo.

La presenza di miceti del genere *Candida*, sia nell'esame batterioscopico sia in quello colturale è in genere dovuta alla contaminazione del materiale da parte della flora del cavo orale, dove la *Candida* è spesso presente, specie dopo terapie antibiotiche più o meno prolungate nel tempo. Proprio per queste caratteristiche è opportuno non segnalare la presenza nei referti anche perché le polmoniti da *Candida* si osservano esclusivamente negli immunodepressi gravi e la diagnosi eziologica può essere fatta solo con una conferma istologica.

Oltre ai classici esami colturali possono essere eseguiti dei test rapidi particolarmente utili per confermare il sospetto di polmonite da *Streptococcus pneumoniae* o da *Legionella pneumophila*, impiegando metodi immunocromatografici dotati di buona sensibilità ed ottima specificità su urina in cui si ritrovano gli antigeni solubili dei suddetti batteri in corso d'infezione acuta.

Purtroppo però il test può risultare positivo anche dopo alcuni mesi dall'esordio dell'infezione da *L. pneumophila* o in soggetti vaccinati per lo pneumococco ed è quindi sempre raccomandabile eseguire in parallelo anche la coltura.

Aspirato bronchiale

È scarsamente utile per le indagini colturali così come il bronco lavaggio che è invece valido per ricercare alcuni specifici patogeni quali, legionelle e micobatteri.

Lavaggio bronco alveolare

Costituisce la tecnica più idonea per la coltura di materiali delle basse vie respiratorie, anche se invasiva per il paziente. Permette la crescita di basse cariche batteriche e, se eseguito con tecnica protetta, non risulta contaminato dalla flora delle vie aeree superiori.

Se si desidera eseguire una conta batterica accurata è necessario conoscere il quantitativo (in ml) di soluzione fisiologica iniettata nel paziente che deve essere moltiplicato per il numero di colonie contate in piastra.

I terreni utilizzabili sono quelli indicati per l'espettorato con in più quello selettivo per *Legionella* spp. quale BCYE α : in questo caso l'incubazione della piastra deve avvenire in atmosfera satura di umidità, in aerobiosi o CO₂ al 5% per una settimana. Proprio per rispettare questi tempi lunghi, l'esame colturale per *legionella* è scarsamente impiegato in diagnostica preferendogli la ricerca di anticorpi specifici in IFA, l'uso di sonde molecolari e la ricerca dell'antigene solubile nelle urine.

Per l'interpretazione dei risultati il medico deve accuratamente valutare il quadro clinico del paziente e giovare del dato microbiologico a conferma della diagnosi, anche in considerazione del fatto che sovente la coltura è negativa per la *legionella* e che gli pneumococchi sono spesso dei semplici colonizzatori delle vie aeree superiori.

Liquido pleurico

Questo materiale è di norma sterile e la coltura è indicata in presenza di versamenti pleurici in corso di polmonite. Si ricercano i germi aerobi ed anaerobi facoltativi, in

casi particolari gli anaerobi stretti, i micobatteri, *Legionella* spp., *Nocardia* spp., *Cryptococcus neoformans* ed altri miceti dimorfi. I terreni di coltura impiegati sono quelli indicati per l'espettorato.

Alte vie respiratorie

Tampone faringeo

L'esame colturale viene di norma richiesto per evidenziare la presenza dello *Streptococcus pyogenes* che è il patogeno più comunemente in causa nelle faringo-tonsilliti batteriche.

La semina del tampone, inserito in un terreno di trasporto (ad esempio terreno di Stuart) se non seminato entro 2 ore dal prelievo, viene eseguita con la tecnica dei tre quadranti su agar sangue Columbia con l'aggiunta della miscela CNA (colistina e acido nalidixico) per ottenere la crescita di colonie isolate e ridurre fortemente la presenza della flora normale del cavo orale, in particolare neisseriae apatogene, stafilococchi coagulasi negativi, enterobatteri, streptococchi α -emolitici.

In casi particolari, se si desidera individuare anche cariche basse, il tampone può essere prima inserito in brodo Todd-Hewitt con CNA e, dopo alcune ore d'incubazione in termostato a 37 °C per un arricchimento, seminato su piastra di agar sangue.

L'incubazione può essere fatta in atmosfera normale, ma in anaerobiosi si ottiene un'emolisi molto più marcata evidenziando l'attività emolitica della streptolisina O, labile all'ossigeno ambientale, e permettendo un migliore riconoscimento dei ceppi sprovvisti di streptolisina S.

Talora si isolano anche streptococchi appartenenti a gruppi C e G che possono causare faringite e sono stati associati a casi di glomerulonefrite.

Il tampone faringeo può essere richiesto anche per la ricerca di soggetti portatori in faringe del meningococco e, talora, del gonococco: in questo caso il terreno di elezione è l'agar cioccolato di Thayer-Martin o agar New York City, incubando per 24 ore a 37 °C in CO₂.

Può essere richiesta anche la coltura per *Corynebacterium diphtheriae* ed in questo caso il tampone deve essere seminato su provette di terreno di Loeffler, a becco di flauto ed incubato a 37 °C per 24 ore in aerobiosi e sottocoltivando in agar sangue o agar cistina tellurito per favorire l'isolamento del batterio rispetto alla flora batterica commensale.

Nel caso si sospetti un'angina di Vincent basta prelevare con tampone una piccola quantità del materiale biancastro presente sulla mucosa del cavo orale, strisciarla su un vetrino portaoggetti che, dopo fissaggio alla fiamma, è colorato con la colorazione di Gram. La diagnosi è confermata se si ritrovano insieme grandi quantità di forme fusospirillari evidenziabili con una semplice colorazione con carbolfucsina per un tempo di circa 5 minuti.

Un batterio di cui si conosce ancora poco l'eventuale ruolo patogeno è l'*Arcanobacterium haemolyticum* associato a faringiti in giovani adulti, ma isolato anche da ferite infette e, seppure raramente, in corso d'infezioni sistemiche con setticemia o endocarditi ed osteomieliti. Si presenta in forma di bacilli o coccobacilli Gram positivi che crescono bene su piastre di agar sangue Columbia formando colonie molto piccole, biancastre e con una piccola zona di β -emolisi.

Il tampone faringeo può anche essere impiegato per la ricerca diretta dell'antigene dello *Streptococcus pyogenes*: questa tecnica è di solito utilizzata dai pediatri per il riconoscimento di una faringotonsillite batterica e quindi per iniziare rapidamente una terapia antibiotica mirata. In commercio esistono alcuni kit che però debbono essere attentamente valutati per verificarne la sensibilità nei confronti dell'esame colturale tradizionale: infatti tendono a riconoscere lo streptococco di gruppo A solo quando si presenta in cariche medio-alte.

Tampone naso-faringeo

Questo prelievo viene di norma eseguito per la ricerca del bacillo della pertosse o per individuare i portatori di meningococco, del bacillo difterico o dello *Staphylococcus aureus*. Lo *Staphylococcus aureus* si ricerca su piastre di agar sale mannite per le indicazioni già fornite nella descrizione del prelievo nasale.

La ricerca di *Bordetella pertussis* deve essere fatta solo nel periodo catarrale della malattia e si esegue seminando il tampone su agar al carbone con e senza cefalexina, antibiotico che inibisce la flora commensale, ma che può avere anche un'azione inibente sulla *Bordetella*. Il terreno deve essere fresco in quanto la sua stabilità è di circa un mese: si incuba in aerobiosi per almeno una settimana creando un ambiente umido nel contenitore, che di solito è costituito da una giara con una carta bibula sul fondo imbevuta di acqua distillata sterile e chiusa con il coperchio. La crescita deve essere osservata ogni giorno a partire dal terzo.

Il meningococco ed il corinebatterio si isolano sui terreni indicati per la semina del tampone faringeo.

Tampone orale

Può essere richiesto per verificare una candidosi del cavo orale: in tal caso si impiegano l'agar Sabouraud con o senza l'aggiunta di agar Mycosel® o simili contenenti antibiotici e/o cicloeximide per inibire la flora batterica e le muffe. Una diagnosi diretta e rapida si può fare strisciando sopra un vetrino portaoggetti una piccola porzione del materiale biancastro prelevato con una spatola, mischiato con una goccia di soluzione fisiologica sterile e guardato subito al microscopico a piccolo e forte ingrandimento per riconoscere le blastospore e/o le pseudoife tipiche della *Candida*.

Tampone auricolare

L'esame può essere richiesto in caso di otite media acuta o cronica e, talora, di otite esterna. In quest'ultimo caso il prelievo deve essere eseguito facendo prima una pulizia del canale con un tampone sterile che poi è gettato via: si impiega in seguito un altro tampone sterile che è strisciato sulle pareti del canale e che viene seminato sui seguenti terreni di coltura: agar sangue Columbia con e senza CNA, agar sale mannite, agar Sabouraud, agar Mycosel® o simili, agar MacConkey e agar Pseudosel® o simili, selettivi per *Pseudomonas*.

Se la secrezione è abbondante è opportuno fare anche, con un altro tampone, uno striscio batterioscopico da colorare al Gram, permettendo d'osservare direttamente spore fungine, in particolare del genere *Aspergillus*, causa non rara d'infezione specie in pazienti trattati a lungo con antibiotici o cortisonici locali o sistemici.

In caso di otite media acuta o cronica il prelievo deve essere eseguito dallo specialista otorino impiegando tecniche che permettano il prelievo dall'orecchio medio (timpanocentesi) senza contaminare il campione con la flora batterica residente del canale auricolare esterno.

I terreni da usare sono gli stessi indicati per l'otite esterna con l'aggiunta di agar cioccolato con bacitracina per l'isolamento degli emofili ed agar sangue con emina e vitamina K, con e senza aggiunta di kanamicina e vancomicina, per l'isolamento di eventuali batteri anaerobi, talora responsabili dell'infezione. Anche in questo caso è opportuno allestire uno striscio batterioscopico da colorare al Gram per avere un quadro diretto della flora batterica coinvolta nel processo infettivo.

Apparato uro-genitale

Urinocoltura

Le infezioni delle vie urinarie sono, dopo quelle dell'apparato respiratorio, le più frequenti nella popolazione generale e pertanto il ricorso a questo esame colturale è molto comune tanto che le urinocolture costituiscono il maggior carico di lavoro di un laboratorio di microbiologia.

L'urina è il campione ideale per verificare la presenza di un'infezione in quanto, di norma in tale evenienza, si riscontra un numero elevato di batteri, spesso accompagnati anche da numerosi leucociti.

Tuttavia deve essere posta particolare attenzione alla fase del prelievo eseguendo la raccolta del campione cercando di evitarne la contaminazione con la flora batterica residente in uretra o in vagina. Le urine dovrebbero essere seminate quanto prima possibile dopo la raccolta o altrimenti mantenute in frigorifero per impedire la sovra crescita batterica.

La coltura classica prevede l'impiego di diversi terreni ma di solito ci si limita ai seguenti: agar sangue Columbia per la crescita dei batteri più esigenti, agar MacConkey, agar sale mannite, agar sangue Columbia CNA o uno simile per l'isolamento degli enterococchi e agar Sabouraud per la ricerca dei miceti del genere *Candida*.

La semina dell'urina è eseguita con l'impiego di un'ansa calibrata sterile in plastica monouso, da 1 o 10 µl con la tecnica dei quattro quadranti: la carica batterica del campione è calcolata moltiplicando il numero delle colonie cresciute sulla piastra per 1000 o per 100, a seconda del tipo di ansa impiegata. Un altro metodo più preciso, ma più lungo e dispendioso, è quello della diluizione scalare dell'urina a partire dalla diluizione 1/10 fino ad 1/10.000 ed incorporandone 1 ml in 15-20 ml di agar triptoso, precedente fuso a bagno maria e mantenuto alla temperatura di circa 45 °C. Dopo la solidificazione s'incuba a 37 °C e si leggono le colonie sviluppate nelle singole piastre (considerare solo quelle con crescita compresa tra 30 e 300 colonie), moltiplicandone il numero per il fattore di diluizione dell'urina.

In questi ultimi anni sono stati proposti, da varie ditte del settore, dei terreni cromogenici che permettono di riconoscere il microrganismo dal colore assunto dalle colonie durante la crescita, consentendo al tecnico di valutare immediatamente la purezza o meno delle colonie e quindi di allestire con sicurezza un antibiogramma, cosa che non è sempre possibile ottenere con i terreni tradizionali [► FOTO].

Nel CD-Rom allegato, cui si rimanda, sono riportati molti esempi dell'impiego del terreno cromogenico con campioni contenenti flora monomicrobica o polimicrobica, che ci permettono di verificare la loro effettiva validità pratica.

Un metodo più rapido, ma meno sensibile della coltura, è l'impiego di "dip slides" costituiti da spatole di plastica simili ad un vetrino portaoggetti, ricoperte dal terreno di coltura, che sono immerse nell'urina e poi messi in termostato per permettere la crescita batterica. Nella foto sono presentati uno slide non seminato ed uno seminato con un'urina positiva per *Escherichia coli* ed enterococchi [► FOTO].

I *dip-slides* sono molto comodi in quanto il prelievo può essere fatto anche al letto del malato e si prestano bene al trasporto, ma presentano l'inconveniente di non permettere l'isolamento delle colonie quando la carica batterica supera le 100.000 ufc/ml, costringendo l'operatore ad eseguire una subcoltura su terreno tradizionale e ad attendere ulteriori 18-24 ore per l'identificazione di specie e l'antibiogramma. Per evitare che questo accada, vista la scarsità di terreno a disposizione, è possibile immergere lo slide per metà nell'urina e poi eseguire alcune strisciate con un'ansa sterile dal basso verso l'alto, toccando la parte di terreno bagnata dal campione: in tal modo è possibile ottenere colonie isolate nella parte più alta dello slide.

In commercio esistono anche alcuni strumenti semiautomatici o completamente automatici che permettono lo screening delle urinocolture in tempi rapidi (da pochi minuti ad alcune ore) basati su diverse tecniche: colorimetria, spettrofotometria, citofluorimetria, bioluminescenza. L'utilizzo di questi apparecchi deve essere valutato attentamente per stabilirne la validità operativa e l'attendibilità analitica nella propria situazione di lavoro e per individuarne pregi e difetti ed anche i costi globali di gestione.

Il microbiologo deve porre un'attenzione particolare all'esito dell'esame colturale per stabilirne l'idoneità alle indagini successive, quali l'identificazione del batterio a livello di specie e l'antibiogramma.

Per convenzione ampiamente accettata si tende di norma a dare significatività diagnostica ai campioni urinari che presentano una carica batterica superiore o uguale a 100.000 ufc/ml, se in coltura pura o al massimo con due diversi microrganismi potenzialmente patogeni. Tuttavia vi sono casi in cui è necessario tenere conto assolutamente anche di cariche più basse perché sono comunque segno d'infezione delle vie urinarie nelle seguenti situazioni cliniche:

- a) in presenza di leucocituria, che spesso accompagna le urine infette, un esito colturale negativo non esclude la presenza di altri batteri, in particolare il *Mycobacterium tuberculosis* o altri MOTT, micoplasmi, *Chlamydia trachomatis*, "fastidious microorganisms" quali emofili, lattobacilli, *Gardnerella vaginalis*, ma potrebbe trattarsi anche di una batteriuria intermittente, valutabile con più esami ripetuti;
- b) nella sindrome uretrale, specie della donna, si possono incontrare anche cariche molto basse (inferiori a 1000 ufc/ml), causate da *Chlamydia trachomatis*, talora dal gonococco oppure da *Herpes simplex*;
- c) in un paziente maschio, se il prelievo è stato fatto correttamente, una carica bassa in presenza di sintomatologia uretrale deve essere considerata, specie se si isola un potenziale patogeno;

- d) si deve tener conto di un'eventuale concomitante terapia o regime idratante perché l'introduzione di forti quantità di liquido diluisce l'urina e riduce la carica originaria;
- e) in soggetti ospedalizzati con catetere a permanenza o con insufficienza renale, che hanno subito da poco interventi chirurgici in sede urinaria o che presentano infezioni urinarie recidivanti;
- f) soggetti sottoposti a terapia antibiotica dove la scarsa carica batterica potrebbe essere un segno importante dell'inefficacia del farmaco ad eliminare il patogeno in causa.

Si possono, in definitiva, fare queste considerazioni interpretative di massima, considerando corretto il prelievo del campione ed un'ideale conservazione dello stesso (cose purtroppo tutt'altro che scontate):

1. Una carica superiore a 100.000 ufc/ml, specie se con isolamento di un solo batterio potenzialmente patogeno, deve essere considerata come segno sicuro d'infezione.
2. Cariche comprese tra 1.000 e 100.000 ufc/ml sono di solito considerate come contaminazioni, specie se si isolano più germi di solito colonizzanti l'uretra esterna, ma impongono comunque una ripetizione dell'esame su un altro campione e la valutazione di una contemporanea sintomatologia clinica. Attenzione ai campioni provenienti da giovani donne non ricoverate le quali possono presentare cariche in questa fascia con l'isolamento di *Staphylococcus saprophyticus* da considerare come vero patogeno e che pertanto necessita dell'identificazione a livello di specie.
3. Cariche inferiori a 1.000 ufc/ml sono di norma considerate da contaminazione a meno che non ci si ritrovi in una delle situazioni indicate in precedenza oppure il prelievo dell'urina sia stato fatto con puntura sovrapubica o ureterale.

I batteri da considerare potenzialmente patogeni del tratto urinario sono tutti gli Enterobatteri ricordando che l'*Escherichia coli* si isola in oltre il 75% dei campioni di soggetti esterni ed in oltre il 50% di quelli ricoverati in ospedale. Tra i Gram-positivi i più frequenti sono gli enterococchi (in grande maggioranza della specie *E. faecalis*), lo *Staphylococcus epidermidis* e, molto più raro, lo *Staphylococcus aureus*.

Patogeno deve essere ovviamente considerato il *Mycobacterium tuberculosis*, in qualunque carica ritrovato, così come i germi anaerobi però solo se isolati da puntura sovrapubica. Per i miceti del genere *Candida* si considerano significative cariche superiori a 10.000 ufc/ml specie se la positività è confermata su più campioni.

La ricerca dei micobatteri deve essere eseguita con le stesse modalità dell'urinocoltura per germi comuni ma su tre campioni diversi per aumentare la possibilità dell'isolamento: non si esegue più, come una volta, la coltura sulle urine raccolte nelle 24 ore.

I micoplasmi possono essere ricercati anche nel sedimento urinario ma la ricerca elettiva è quella del tampone uretrale per l'uomo e uretrale e/o endocervicale (e non vaginale!) per la donna.

La *Chlamydia trachomatis* può essere ricercata nelle urine raccolte al primo mitto o con tampone endocervicale impiegando varie metodiche come colture cellulari, immunofluorescenza diretta, e tecniche di biologia molecolare, in particolare PCR.

A completamento del quadro diagnostico è opportuno eseguire sul campione urinario anche la ricerca del PAR test (potere antibiotico residuo) che mette in evidenza la presenza

nelle urine di chemioterapici o antibiotici la cui positività può falsare il risultato dell'esame colturale. In commercio esistono piastre pronte che contengono incorporato nell'agar una coltura di *Bacillus stearothermophilus* o di altri germi sensibili a molti farmaci antibatterici impiegati in terapia: il test si esegue ponendo un dischetto di carta bibula impregnato d'urina sulla superficie della piastra, nella quale possono essere saggiati sei campioni diversi: si incuba alla temperatura indicata (a 60 °C per il *Bacillus stearothermophilus*) e si osserva la presenza o l'assenza di un alone d'inibizione della crescita che sarà più o meno marcato a seconda della concentrazione raggiunta dal farmaco nell'urina [► FOTO].

Se il test è negativo con coltura negativa l'infezione è assente, ma se la coltura è positiva l'infezione è presente.

Se il test è positivo, e quindi è in atto una terapia antibatterica, e si riscontra una carica significativa è molto probabile che il farmaco non funzioni sul ceppo isolato in quanto non è in grado d'inibirne la crescita.

Se il test è positivo in assenza di crescita è consigliabile ripeterlo insieme all'urinocoltura dopo alcuni giorni dalla sospensione della terapia per evitare di dare una risposta falsamente negativa.

Per avere una rapida informazione sull'urina in esame può essere eseguita anche una colorazione di Gram su una goccia d'urina ben agitata: in tal modo è possibile osservare l'eventuale presenza di leucociti oltre a quella dei batteri di cui si nota la morfologia e l'appartenenza al gruppo dei Gram positivi o Gram negativi. La presenza di una o più cellule batteriche per campo microscopico a 1000× (immersione) o di uno o più leucociti correla abbastanza bene con cariche batteriche superiori a 100.000 ufc/ml o piuria.

Tampone vaginale

Il campione è prelevato con un tampone sterile ed inviato in laboratorio nel terreno di trasporto (in genere Stuart) dove può rimanere fino a 24-48 ore conservato a temperatura ambiente.

Di norma si ricercano i lattobacilli, i miceti del genere *Candida* e la *Gardnerella vaginalis*: tuttavia se si isolano numerose colonie di *Staphylococcus aureus* o di batteri Gram negativi è utile indicarne la presenza al medico curante che valuterà, anche in base alla risposta dell'esame batterioscopico, l'opportunità o meno di impiegare una terapia antibiotica specifica anche per questi batteri.

In genere alla 35-37^a settimana di gestazione si esegue anche la ricerca degli *Streptococcus agalactiae* per riconoscere le donne portatrici del germe nel canale vaginale, che potrebbe essere trasmesso al neonato al momento del parto causandogli danni gravi e talora mortali.

I lattobacilli crescono meglio in presenza di CO₂ e la semina può essere fatta su agar sangue Columbia o su agar Rogosa dove crescono con le caratteristiche illustrate.

L'incubazione in anaerobiosi è prolungata per 48 ore, tempo necessario anche al completo sviluppo della *Gardnerella vaginalis* per la quale è opportuno impiegare un agar al sangue umano perché in tal modo è possibile verificare l'emolisi beta caratteristica di questo batterio.

La ricerca dei miceti si esegue su agar Sabouraud con o senza aggiunta d'antibiotici. In caso di positività si osservano le caratteristiche colonie grandi, biancastre, dal

tipico odore di lievito di birra. Il numero di colonie isolate non correla con la gravità dell'infezione.

Per diagnosticare meglio la presenza di specie diverse di *Candida* si può impiegare un terreno cromogenico che ci indica con sufficiente attendibilità anche la specie, evitando di eseguire per la conferma della *Candida albicans*, la prova del tubo germinativo o altri test più costosi [► FOTO].

La ricerca del *Trichomonas vaginalis* può essere fatta osservando a fresco, al microscopio ottico, il materiale vaginale appena prelevato o seminandone una parte o un tampone in brodo per *Trichomonas* incubando a 37 °C per 48 ore.

Tampone cervicale

Il campione è prelevato dal canale cervicale per la ricerca di *Neisseria gonorrhoeae* e di *Chlamydia trachomatis* impiegando per i primi i metodi colturali tradizionali e per la clamidia le colture cellulari o le tecniche di biologia molecolare con PCR. Su richiesta possono essere ricercati anche *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*.

Il prelevatore deve fare attenzione a raccogliere il materiale direttamente dall'interno del canale cervicale ed a non contaminarlo con le secrezioni vaginali; quindi è necessario impiegare lo *speculum* monouso sterile.

Il gonococco si ricerca seminando il materiale raccolto con tampone su agar al cioccolato con aggiunta di antibiotici ed antifungini per inibire la flora commensale (ad esempio agar New York City, o agar Tayer Martin), incubando per 48 ore a 37 °C in atmosfera arricchita di CO₂, che si ottiene facilmente inserendo un mozzicone di candela acceso in una "candle jar" e chiudendo ermeticamente il coperchio: allo spengersi della candela si sarà ottenuta una quantità di CO₂ sufficiente allo sviluppo del gonococco.

La ricerca della *Chlamydia trachomatis*, che non cresce su terreni agarizzati in quanto è un parassita intracellulare obbligato, si può fare impiegando colture cellulari della linea McCoy in cui viene seminato il materiale ed osservando nel tempo le caratteristiche modificazioni del monostrato, oppure con altre tecniche (IFD, immunoenzimatiche, ibridizzazione in situ, PCR).

La ricerca dei micoplasmi si esegue seminando il campione su agar A7 sul quale crescono bene sia il *Mycoplasma hominis* (con colonie tipiche ad uovo fritto) sia l'*Ureaplasma urealyticum* con colonie molto più piccole rotolanti, "a riccio", di colore brunastro.

Apparato intestinale

Coprocoltura

Di norma questa richiesta viene fatta per la ricerca dei più comuni patogeni enterici: *Campylobacter*, *Salmonella* e *Shigella*, ma possono essere ricercati molti altri microrganismi quali *Aeromonas*, *Escherichia coli* enteropatogeni, *Vibrio* spp., *Yersinia*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*: per questi ultimi tre tipi di batterio si ricerca la tossina specifica e non il microrganismo stesso. Tra i germi anaerobi particolarmente importante è il *C. perfringens*, attualmente responsabile più frequentemente di tossinfezioni alimentari.

Quindi il medico deve chiaramente indicare nella richiesta quali microrganismi ricercare altrimenti il laboratorio si limiterà all'esame di routine.

Esistono differenti terreni di coltura che possono essere utilmente impiegati per la ricerca di *Salmonella* e *Shigella*, ma i più comuni sono i seguenti: agar Salmonella Shigella (SS), agar Hektoen enteric, agar xylosio-lisina-desossicolato (XLD), ognuno dei quali presenta caratteristiche particolari (più o meno selettivi nei confronti della flora commensale) che debbono essere attentamente conosciute per ottenere i migliori risultati. Spesso si associa un terreno più selettivo (agar SS o agar Hektoen) ad uno meno selettivo (agar XLD), per essere certi di non perdere i ceppi più delicati quali la *Shigella*.

Può essere utile seminare una parte del campione fecale anche in un terreno liquido di arricchimento quale ad esempio il brodo al selenito che favorisce l'isolamento di ceppi presenti anche in bassa carica, ma bisogna essere rigorosi nell'eseguire sottocolture sui terreni primari entro 8-12 ore dall'incubazione in termostato perché altrimenti si assiste ad una sovracrescita della flora commensale che può impedire lo sviluppo del patogeno.

Da qualche tempo sono entrati in commercio dei terreni cromogeni che presentano il grosso vantaggio di evidenziare i vari generi in base alla colorazione della colonia ed alla modifica del terreno circostante, riducendo i test necessari per il riconoscimento della specie.

Il *Campylobacter* si ricerca con terreni specifici che richiedono comunque un'incubazione in atmosfera microaerofila che si ottiene con l'impiego di idonee buste del commercio da inserire in giare a tenuta ermetica: le piastre devono restare in termostato per almeno 48 ore prima di essere controllate e la temperatura ottimale è di 42-43 °C perché questi batteri sono termofili e crescono meglio in queste condizioni. Tuttavia si è visto che la crescita avviene anche a 37 °C e quindi si possono incubare a questa temperatura se non si dispone di un termostato separato per la loro ricerca.

I terreni più indicati per la crescita degli altri microrganismi causa d'infezioni gastroenteriche sono descritti nei paragrafi a loro dedicati più avanti.

Identificazione batterica

Una volta ottenute colonie isolate sulle piastre di coltura è possibile avere, già dalla loro osservazione diretta, un'idea del tipo di batterio in base alla forma, al colore ed all'odore delle stesse, nonché delle eventuali modifiche del terreno intorno alla crescita (emolisi, opacizzazione, variazione del colore originario, ecc.).

È utile talora eseguire anche una colorazione di Gram prelevando con l'ansa una piccola porzione di colonia e stemperandola su una goccia d'acqua distillata sterile messa su un vetrino porta oggetti. Dopo essiccamento a temperatura ambiente o in termostato, si fissa il vetrino alla fiamma e poi si colora. In tal modo si evidenzia la morfologia cellulare del batterio (cocco, coccobacillo, bacillo, vibrione, ecc.), oltre a confermare la Gram positività o negatività.

Per l'identificazione del ceppo a livello di specie è comunque necessario impiegare altre metodiche quali test biochimici, di fermentazione o ossidazione di zuccheri, di

crescita su terreni selettivi o contenenti fattori inibenti o fattori di crescita. Queste prove possono essere eseguite anche con sistemi preparati in “casa” ma esistono da anni vari sistemi commerciali manuali o automatici che danno, per lo meno per gran parte dei germi Gram negativi enterici, degli stafilococchi e degli streptococchi, buone *performance* di attendibilità a livello identificativo di specie o, quanto meno, di genere.

Il microbiologo deve comunque porre la massima attenzione a quanto proposto dal sistema in quanto un’indicazione viene sempre data anche se poi può rivelarsi non corretta: è proprio l’esperienza acquisita sul campo che ci permette di accorgerci che qualche cosa non va e ci consiglia di fare ulteriori prove aggiuntive a conferma del dato o magari verificare la purezza della colonia.

Capitolo IV

Cocchi Gram positivi

Streptococchi

Il genere *Streptococcus* comprende numerose specie di interesse in patologia umana ma i più comuni ed importanti rappresentanti causa di malattie infettive sono *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. Gli enterococchi, un tempo classificati anch'essi tra gli streptococchi (nel gruppo D), sono invece considerati un genere a parte, così come gli streptococchi strettamente anaerobi.

Sono colonizzatori della pelle e delle mucose e fanno parte della flora residente dell'apparato respiratorio, genitale ed intestinale.

In base alla classificazione di Lancefield, basata sulle diverse proprietà antigeniche della membrana cellulare, gli streptococchi sono divisi in gruppi dall'A al G (senza il gruppo E), anche se specie diverse possono essere incluse nello stesso gruppo per la presenza dello stesso antigene.

Per comodità gli streptococchi sono stati classificati in tre gruppi: α e β emolitici o non emolitici, in base alla capacità del germe di emolizzare in parte (α -emolitici), completamente (β -emolitici) o affatto l'emoglobina dei globuli rossi di alcuni animali contenuti nei terreni di coltura.

Sono immobili e catalasi negativi

Crescono meglio in presenza di CO₂ (in particolare *Streptococcus pneumoniae* e certi streptococchi α -emolitici), mentre in anaerobiosi è esaltata la β -emolisi dei ceppi che la producono.

La maggior parte dei ceppi cresce bene solo in terreni arricchiti con sangue dov'è apprezzabile anche l'emolisi, mentre gli streptococchi con variante nutrizionale si osservano solo se il materiale biologico è seminato su agar cioccolato, su agar brucella al sangue di cavallo o in tioglicollato. Questi batteri sono attualmente inquadrati tassonomicamente come generi a sé stanti con i nomi di *Abiotrophia* e *Granulicatella*

Streptococcus pyogenes

Streptococcus pyogenes è un batterio Gram positivo, anaerobio facoltativo, catalasi negativo, che produce emolisi β su piastre di agar sangue, di forma coccoide, che tendono a disporsi in catenelle, che risultano più lunghe in terreni liquidi.

La specie appartiene al gruppo A di Lancefield.

S. pyogenes è la principale causa delle faringotonsilliti batteriche, ma può causare tutta una serie di altre infezioni, in vari organi ed apparati, anche estremamente gravi come la fascite necrotizzante. Si può isolare da tamponi vaginali di bambine prepuberi che spesso sono colonizzate o infettate dal germe nell'orofaringe.

Isolamento

Il germe cresce bene su agar sangue di montone al 5% in aria ambiente o in CO₂ ma meglio, e con alone d'emolisi molto evidente, in atmosfera anaerobia.

Se il campione contiene flora mista residente è conveniente utilizzare terreni selettivi come, ad esempio, agar sangue Columbia addizionato di colistina, acido nalidixico (CNA) e/o cristalvioletto.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono relativamente grandi (> 0,5 mm di diametro dopo incubazione di 24 ore) con un'emolisi evidente [► FOTO].

Identificazione

L'identificazione si esegue mediante agglutinazione delle colonie con antisieri per confermarne l'appartenenza al gruppo A. Esistono in commercio molti kit, tutti validi. Può essere eseguita anche la prova con un dischetto di bacitracina (da 0,04 U) da porre sulla piastra di agar sangue sulla parte più ricca della semina: dopo incubazione in aria o CO₂ per una notte, ogni zona d'inibizione osservata intorno al disco indica sensibilità e quindi l'appartenenza al gruppo A (lo sono il 99% dei ceppi).

Bisogna porre attenzione al fatto che una piccola percentuale di ceppi del gruppo B, il 10-20% dei gruppi C e G ed alcuni streptococchi alfa emolitici, sono ugualmente sensibili alla bacitracina [► FOTO].

Antibiogramma

Non sono mai stati ancora segnalati ceppi resistenti alla penicillina o ai β-lattamici, che sono gli antibiotici di prima scelta per la terapia delle infezioni causate dallo *Streptococcus pyogenes* per cui non sarebbe necessario, di fatto, eseguire l'antibiogramma.

Tuttavia, la comparsa di ceppi resistenti ai macrolidi, può consigliare l'esecuzione del test per questa classe di farmaci, che si esegue su piastre di Mueller-Hinton al sangue di montone in capnofilia per una notte.

Se si vuole approfondire la tipologia della resistenza ai macrolidi si esegue un normale antibiogramma avendo l'accortezza di porre i dischi di eritromicina e di clindamicina a due centimetri di distanza tra centro e centro.

A seconda della tipologia degli aloni d'inibizione intorno ai due dischi si possono identificare i seguenti fenotipi di resistenza [► FOTO]:

- A) Crescita batterica completa intorno ad entrambi i dischi: fenotipo costitutivo
- B) Crescita batterica a forma di "D" intorno al disco di clindamicina ed alone assente o piccolo intorno al disco di eritromicina: fenotipo inducibile
- C) Crescita normale intorno al disco di clindamicina che tende ad unirsi con la crescita modesta intorno al disco di eritromicina: fenotipo a pompa d'efflusso

Pertanto in base alla risposta a questo test i ceppi che presentano una resistenza costitutiva o inducibile debbono essere considerati resistenti a tutti i tipi di macrolidi,

alle lincosamidi ed alle streptogramine (MLS_B), mentre i ceppi che presentano una resistenza con fenotipo a pompa d'efflusso sono resistenti ai macrolidi a 14 e 15 atomi di C, sensibili a quelli a 16 atomi di C e sensibili alle lincosamidi e streptogramine.

Streptococcus agalactiae

Sono cocchi Gram positivi in corte catene, immobili, che vengono agglutinati dall'antisiero antistreptococco di tipo B della classificazione della Lancefield e pertanto chiamati anche streptococchi β -emolitici di gruppo B, di cui sono gli unici rappresentanti. Sono germi di solito commensali in alcuni distretti corporei (in particolare intestino e vagina), ma possono comportarsi anche da opportunisti e dare infezioni vere (setticemie, infezioni cutanee, genito-urinarie, osteomieliti, endocarditi).

Particolarmente gravi sono le infezioni trasmesse al neonato durante il parto dalla madre portatrice del germe in vagina (sepsi, meningite e polmonite con due quadri clinici ben definiti: *early o late onset disease* a secondo della precocità con cui si osservano i segni dell'infezione). Per tale motivo in molti ospedali è richiesto un tampone vaginale e rettale per riconoscere lo stato di portatrice, la cui esecuzione è di solito fatta con un unico tampone inserito prima in vagina e poi nel retto della donna.

Isolamento

Si può usare l'agar sangue per la coltura di materiali biologici di norma sterili. Invece per campioni provenienti da distretti con flora residente è opportuno associare un agar sangue CNA (con aggiunta di colistina ed acido nalidixico per inibire la crescita dei batteri Gram negativi e di cristalvioletto per inibire quella degli stafilococchi e difteroidi). L'incubazione può avvenire in aria a 37 °C, anche se l'emolisi su sangue è più evidente in CO₂ o, meglio, in anaerobiosi.

Il germe cresce in 24 ore, seppure con colonie piccole, anche sui nuovi terreni cromogenici, tipo CPS ID® [► FOTO].

Identificazione

Di solito la grande maggioranza dei ceppi produce una β -emolisi particolare su agar sangue (alone maggiore di quella degli streptococchi di gruppo A, ma meno intensa e che si evidenzia bene asportando la colonia dall'agar) anche se esistono ceppi non emolitici [► FOTO].

Sono quasi sempre resistenti alla bacitracina ed ippurato e *camp-test* positivi. Per conferma si usano gli antisieri specifici del commercio, tutti validi.

Antibiogramma

L'organismo internazionale di riferimento NCCLS dà indicazione di non eseguire di routine l'antibiogramma; comunque il saggio può essere limitato ai seguenti antibiotici: penicillina o ampicillina, eritromicina, ma possono essere aggiunti anche cloramfenicolo, clindamicina e vancomicina.

Streptococcus pneumoniae

Sono batteri Gram positivi, anaerobi facoltativi, catalasi negativi, di forma coccoide o lanceolata, di meno di 2 μm di diametro, che tendono a disporsi a due a due.

Anche se sono batteri aerobi, alcuni ceppi di *S. pneumoniae* richiedono una atmosfera al 5% di CO_2 per crescere.

S. pneumoniae è la principale causa batterica delle polmoniti acquisite in comunità. Viene isolato dalle emocolture in oltre il 20% dei casi di polmonite. Altre infezioni causate da questo microrganismo includono otite media, congiuntivite, sinusite, meningite ed endocardite. Lo stato di portatore orofaringeo di pneumococchi è abbastanza comune, e ciò può causare problemi interpretativi per le colture degli espettorati.

Isolamento

I campioni per la ricerca dello pneumococco devono essere processati rapidamente entro 2 ore dal prelievo, a causa della fragilità del batterio al di fuori dell'ospite. Lo sviluppo degli *S. pneumoniae* richiede l'uso di terreni di coltura arricchiti con sangue o siero. È preferibile incubarli in termostato a 35 °C con 5% di CO_2 , osservare le colture dopo 18-24 ore, e se negative, reincubarle esaminandole dopo ulteriori 24 ore.

Se il campione contiene flora mista residente è conveniente utilizzare terreni selettivi come, ad esempio, agar sangue Columbia addizionato di colistina, acido nalidixico (CNA) ed il 5% di sangue di montone.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono di solito piccole, alfa emolitiche, e presentano talora una depressione al centro (colonie a "pedina di dama"). Gli pneumococchi possono anche produrre differenti quantità di polisaccaride capsulare che dà alle colonie l'aspetto mucoide (colonie a "goccia di rugiada"), ed una dimensione maggiore [► FOTO].

Identificazione

L'identificazione si ottiene impiegando il test di solubilità in bile ed il test dell'optochina.

Il test di solubilità in bile si esegue depositando una goccia di una soluzione al 10% di desossicolato (bile) direttamente sulla colonia da testare. La coltura è poi incubata per 15 minuti in termostato a 35 °C, evitando che la goccia si spanda sulla piastra. Le colonie di pneumococchi scompaiono o diventano piatte, mentre quelle di altri batteri sono resistenti alla bile e rimangono inalterate.

Per confermare l'identificazione conviene eseguire il test dell'optochina, depositando un disco di optochina su una piastra strisciata con un tampone immerso in brodo in cui sono state inserite ed agitate alcune colonie del microrganismo da testare. La piastra è incubata a 35 °C per 18 ore in termostato al 5% di CO_2 o in una giara con candela: la presenza di un alone di inibizione ≥ 14 mm con un disco di 6 mm, identifica *S. pneumoniae* [► FOTO].

Antibiogramma

Il test è necessario perché sono aumentati i ceppi resistenti alla penicillina con percentuali diverse da paese a paese.

Esecuzione:

- Utilizzare colonie da piastra di agar sangue incubata 18-24 ore in termostato al 5-7% di CO₂.
- L'antibiogramma va eseguito su Mueller-Hinton agar addizionato con il 5% di sangue di montone.
- Aggiustare la torbidità in brodo (non in soluzione fisiologica) con lo spettrofotometro a 0,5 McFarland.
- Inoculare la piastra immediatamente e collocare i dischi, tenendo conto che gli aloni di inibizione possono essere molto larghi. Quindi non disporre più di 3 dischi per piastra di 90 mm. Utilizzare un disco di oxacillina di 1 mg per determinare la resistenza alla penicillina.
- Incubare le piastre a 35 °C in termostato al 5-7% di CO₂ per 20-24 ore.

Le indicazioni del NCCLS per *S. pneumoniae* sono le seguenti:

- Se il diametro dell'oxacillina è ≥ 20 mm: ceppo sensibile alla penicillina
- Se il diametro è ≤ 19 mm, eseguire MIC per la penicillina (E-test® o MIC in microdiluizione in brodo).

Alcuni ceppi possono avere diametri < 19 mm e nonostante avere MIC di $\leq 0,06$ mg/ml e quindi essere comunque sensibili.

- Antibiotici da testare: oxacillina (per la penicillina) ed eventualmente, trimetoprim-sulfametossazolo, ofloxacina o levofloxacina (i ceppi sensibili all'ofloxacina lo saranno anche a levofloxacina), tetraciclina, vancomicina, cloramfenicolo, rifampicina. Per testare penicillina, cefotaxime o ceftriaxone e meropenem utilizzare l'E-test® o una metodica in MIC.

L'NCCLS ha proposto per ceftriaxone e cefotaxime dei valori interpretativi di *break-point* diversi, a seconda che il ceppo sia stato isolato da liquor o da altri materiali, secondo il seguente schema:

	da liquor	da materiali respiratori
S	$\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$
I	$1 \mu\text{g/mL}$	$2 \mu\text{g/mL}$
R	$\geq 2 \mu\text{g/mL}$	$\geq 4 \mu\text{g/mL}$

Come controllo di qualità interno usare il ceppo: *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Streptococchi α -emolitici

Questi streptococchi, sono normali abitanti di alcuni distretti corporei, in particolare dell'oro-faringe dove costituiscono la flora residente numericamente più abbondante ed, in quanto tali, possono essere evidenziati quando si eseguono esami colturali da tamponi faringei, da espettorati o broncoaspirati, da tamponi vaginali ed uretrali, da liquidi seminali: in tali situazioni non debbono essere identificati a livello di specie, ma ci possiamo limitare ad indicarli come streptococchi alfa emolitici o viridanti.

Diverso invece è il caso in cui l'isolamento avvenga da materiali biologici di norma sterili, quali emocolture, liquido peritoneale o pericardico, liquor, ecc., in queste situazioni occorre procedere alla tipizzazione del ceppo isolato e, se del caso, eseguire anche un antibiogramma.

Su agar sangue Columbia le colonie sono piccole e circondate da un debole alone di emolisi α , e la consistenza è diversa a seconda del ceppo isolato, talora friabili, talora adese all'agar.

Streptococchi non emolitici

Questi batteri non debbono essere identificati a livello di specie, a meno che l'isolamento non avvenga da materiali di norma sterili: in tal caso è necessario procedere all'identificazione per riconoscerne ancora la presenza in un ulteriore isolamento dallo stesso materiale o da altri e per valutare anche l'efficacia della terapia antibiotica

Tra questi batteri si deve ricordare lo *Streptococcus bovis* che si isola con una certa frequenza da emocolture di soggetti con neoplasie a livello intestinale, ma può causare anche endocarditi e, raramente, meningiti.

Tipizzazione degli streptococchi α e non emolitici

Questi batteri sono difficilmente tipizzabili anche con l'impiego di sistemi automatici o miniaturizzati ma una rapida differenziazione dei ceppi isolati può essere fatta applicando lo schema della tabella seguente in base alle prove: sensibilità all'optochina, solubilità nella bile, utilizzo dell'esculina in terreno bile esculina e "satellitismo" (crescita del ceppo in vicinanza di colonie di *Staphylococcus aureus*: può essere usato il ceppo ATCC 25923):

Tipo di Streptococco	Sensibilità alla Optochina	Solubilità nella bile	Crescita su agar bile-esculina	Satellitismo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+	-	-
Streptococchi viridanti	-	-	-	-
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	+	-
Varianti nutrizionali	/	/	/	+

Le varianti nutrizionali degli streptococchi sono responsabili in piccola parte di endocarditi o lesioni dell'occhio: per il loro isolamento è necessario ricorrere alla semina su un terreno quale agar triptosio senza sangue, in modo da ottenere una crescita confluyente e poi si semina una striscia di coltura di stafilococco ATCC 25923. Si incuba a 37 °C in CO₂ e si osserverà crescita solo in vicinanza delle colonie di stafilococco. In alternativa si aggiunge al terreno una soluzione di piridossale allo 0,01% sterilizzata per filtrazione in modo da ottenerne una concentrazione finale di 0,001%.

Enterococchi

Gli enterococchi si presentano come cocchi Gram positivi in corte catene o isolati, ma possono avere un aspetto coccobacillare quando si esegue un preparato microscopico da terreni di coltura solidi.

Tutti i ceppi crescono in brodo con il 6,5% di NaCl ed idrolizzano l'esculina in presenza di una concentrazione del 40% di sali biliari. La maggioranza degli stipti idrolizza il pirrolidonil-β-naftilamide (PYR), reazione che può essere utilmente impiegata per individuare con rapidità il ceppo da una coltura. Quasi tutti i ceppi sono identificati come appartenenti al gruppo D di Lancefield per la presenza del relativo antigene nella parete cellulare ma l'individuazione del sierotipo non è sempre facile con l'impiego degli antisieri commerciali e dipende dalla qualità del prodotto e dal metodo di estrazione dell'antigene.

Sono immobili (tranne *E. casseliflavus*, *flavescens* e *gallinarum*).

Gli enterococchi non contengono enzimi citocromici, però possono produrre una pseudocatalasi, che si manifesta come una leggera effervescenza quando si esegue il test della catalasi.

Sono batteri ampiamente diffusi in natura dove riescono a sopravvivere per molto tempo anche in condizioni difficili. Colonizzano l'apparato intestinale e genito-urinario dell'uomo e di molti animali.

La specie di gran lunga più facilmente isolata da campioni biologici dell'uomo è *Enterococcus faecalis*, seguita a molta distanza da *Enterococcus faecium*.

Sono prevalentemente responsabili d'infezioni urinarie, setticemie (specie in pazienti anziani o sottoposti ad interventi operatori sull'intestino o a manovre strumentali invasive), endocarditi, infezioni di ferite.

Gli enterococchi sono la terza causa delle batteriemie nosocomiali, e si stima pro-vochino il 5-20% delle endocarditi batteriche.

Crescono bene nei comuni terreni di coltura, non richiedono CO₂, possono produrre emolisi α o β (quest'ultima su agar sangue di coniglio o di cavallo), ma di norma non sono emolitici su agar sangue di montone.

Sono selezionati nel tratto intestinale dall'uso delle cefalosporine (cui sono intrinsecamente resistenti) impiegate ampiamente in terapia antibiotica sia intra che extra ospedaliera.

Risultano inoltre costitutivamente resistenti a molti altri antibiotici quali clindamicina, trimetoprim/sulfametossazolo, aminoglicosidi che pertanto non debbono essere testati nell'antibiogramma.

Particolare attenzione deve essere posta nella verifica e conferma dei ceppi resistenti alla vancomicina che sono in costante aumento nei campioni clinici: infatti alcuni sistemi automatici, come pure il metodo di Bauer e Kirby, possono non riconoscere questi ceppi e ciò può ovviamente causare gravi inconvenienti nei pazienti infettati da questi stipti, se trattati con farmaci inadeguati. Può essere utilmente impiegato il terreno vancomicina screen agar che permette di evidenziare i ceppi resistenti alla vancomicina.

Isolamento

Gli enterococchi crescono bene nei terreni di coltura arricchiti al sangue, incubati a 35 °C.

Se il campione contiene flora mista residente è conveniente utilizzare terreni selettivi come, ad esempio, agar Columbia sangue addizionato di colistina e acido nalidixico (CNA). È possibile utilizzare anche terreni cromogenici o agar CLED per l'isolamento dalle urine [►► FOTO].

Morfologia delle colonie

Su agar sangue di montone le colonie sono bianche grigiastre, alfa o non emolitiche.

Identificazione

L'identificazione di genere e specie viene eseguita mediante prove biochimiche con sistemi pronti del commercio. Il genere *Enterococcus* presenta le seguenti reazioni positive: PYR, LAP, Bile-esculina, sviluppo in 6,5% NaCl, e crescita a 10° e 45 °C, motilità variabile.

Antibiogramma

Si esegue mediante metodica di Kirby-Bauer o metodiche automatiche. Il Kirby-Bauer si esegue su Mueller-Hinton agar, incubato 16-18 ore per tutti gli antibiotici, eccetto i glicopeptidi che vanno incubati per 24 ore.

Gli antibiotici da saggiare per infezioni non urinarie sono: penicillina o ampicillina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina (screen solo per elevata resistenza) mentre solo nelle urine possono essere aggiunti: ciprofloxacina e/o levofloxacina; norfloxacina; nitrofurantoina; tetraciclina.

Né gli antibiotici attivi contro la parete cellulare (β -lattamici e glicopeptidi), né gli aminoglicosidi, in terapia con un singolo farmaco, hanno un effetto battericida contro le infezioni sistemiche da enterococchi, come l'endocardite. Ma si consegue un'effetto sinergico se si combinano β -lattamici o glicopeptidi con un'aminoglicoside, generalmente gentamicina.

L'effetto sinergico non ha luogo, però, se il ceppo presenta una resistenza di alto livello all'aminoglicoside (HLAR). Per questo motivo, in caso di isolamenti dal sangue o dal liquor, bisogna determinare la HLAR.

Per determinare l'elevata resistenza agli aminoglicosidi (HLAR) mediante Kirby-Bauer si semina il ceppo su una piastra di Mueller-Hinton agar e si usano i dischi di gentamicina da 120 μ g e di streptomina da 300 μ g. Come controllo di qualità interno si utilizzano i seguenti ceppi ATCC:

Ceppo sensibile: *E. faecalis* ATCC 29212

Ceppo resistente: *E. faecalis* ATCC 51299.

Per la lettura degli aloni d'inibizione l'interpretazione è la seguente:

Gentamicina (disco da 120 µg): sensibile ≥10 mm, intermedio = 7-9 mm, resistente ≤ 6 mm

Streptomina (disco da 300 µg) sensibile ≥ 10 mm, intermedio = 7-9 mm, resistente ≤ 6 mm

Per determinare la resistenza alla vancomicina e alla teicoplanina negli enterococchi (GISE e VRE) si può usare la metodica dell'E-test® impiegando preferibilmente Brain Heart Infusion agar oppure Mueller-Hinton agar. La procedura è la seguente:

1. Prelevare le striscie dal congelatore a -20 °C e tenerle per 30 minuti a temperatura ambiente
 2. Sospendere le colonie in soluzione fisiologica per arrivare ad un McFarland di 2 (inoculo denso)
 3. Pipettare 0,2 ml della sospensione su una piastra di 90 mm e strisciarla bene in 3 direzioni
 4. Lasciare asciugare la piastra per 15 minuti
 5. Applicare le striscie facendo attenzione a non muoverle una volta depositate
 6. Incubare a 35 °C per 24 ore. Leggere e riconfermare la lettura dopo 48 ore.
- La lettura deve essere fatta a completa inibizione, includendo piccole colonie o sfumature

Interpretazione dei fenotipi VRE

Fenotipo	Vancomicina		Teicoplanina	
	MIC	Categoria	MIC	Categoria
Van A	≥ 64	R	≥ 16	R
Van B	≥ 16	R	≤ 4	S
Van C1*	8-16	I	≤ 4	S
Van C2**	8-16	I	≤ 4	S
Van D	> 4	I-R	≤ 4	S
Non-VRE	≤ 4	S	≤ 4	S

**E. gallinarum*

***E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. mundtii*

Stafilococchi

Sono batteri a forma di cocci isolati, a diploidi, a tetradi o a grappolo, Gram positivi, catalasi positivi, immobili, ampiamente diffusi in natura ma presenti anche sulla cute e sulle mucose dell'uomo e di molti animali.

Si conoscono due genere diversi: *Staphylococcus* e *Micrococcus* a loro volta divisi in numerose specie che presentano la caratteristica di adattarsi meglio a particolari sedi anatomiche o a particolari organismi.

I batteri del genere *Micrococcus* sono di norma considerati non patogeni quando isolati da campioni biologici dell'uomo, anche se occasionalmente sono stati individuati come veri patogeni in varie situazioni cliniche. Le colonie sono in genere grandi, burrose, bianco giallastre su agar sangue [►► FOTO].

Tra gli stafilococchi la specie più importante in patologia umana è quella dello *Staphylococcus aureus*, seguita dallo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*. Le altre specie di stafilococchi coagulasi negativi si incontrano molto più sporadicamente in campioni clinici significativi e la loro presenza deve essere attentamente valutata prima di considerarli come veri responsabili di un determinato processo infettivo.

Crescono con una certa lentezza nelle urine per cui il ritrovamento di cariche comprese tra 100 a 10.000 ufc/ml deve essere attentamente valutata in soggetti sintomatici e/o con contemporanea presenza di piuria.

Gli stafilococchi sono diventati sempre più resistenti negli anni agli antibiotici, tanto che sono rari i ceppi sensibili alla penicillina, così come è accaduto in seguito per la meticillina a sua volta spesso inattiva, tanto che gli stafilococchi sono divisi in due grandi gruppi ossia meticillino sensibili e meticillino resistenti.

Questa suddivisione è importante anche a fini clinici perché i ceppi di *Staphylococcus aureus* (MRSA), o i coagulasi negativi resistenti alla meticillina (MRCoNS) sono resistenti a tutti gli antibiotici β -lattamici e, spesso, a molti altri antibiotici impiegabili in terapia.

Staphylococcus aureus

È sicuramente la specie più importante e più frequentemente isolata nei campioni clinici di provenienza umana: le infezioni causate da questo batterio sono spesso acute e, se non opportunamente trattate, possono facilmente diffondere in altri organi o tessuti per via ematica.

I ceppi meticillino resistenti si diffondono molto facilmente in ambiente ospedaliero dove pongono grossi problemi terapeutici perché sono resistenti anche a molti altri antibiotici e questo riscontro può essere proprio un segno indiretto della meticillino resistenza del ceppo isolato.

I ceppi produttori di enterotossina possono causare tossinfezioni alimentari.

Isolamento

L'isolamento è facile sui vari terreni di coltura sia selettivi (agar sale mannite, o altri), che non selettivi.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono di solito grandi (6-8 mm di diametro), lisce, a margini regolari e spesso colorate dal crema al giallo per la produzione di pigmento dorato ("aureus") in

seguito alla fermentazione della mannite contenuta nel terreno di coltura. Molti ceppi sono β -emolitici su agar sangue con emolisi molto marcata [► FOTO].

Su agar sale mannite le colonie crescono bene a margini netti, cremose, con un tipico ed acre odore di formaggio fermentato, e si colorano in giallo determinando anche la colorazione in giallo del terreno sotto le colonie [► FOTO].

Per confronto è riportata una piastra con un ceppo mannitolo positivo ed uno mannitolo negativo.

È opportuno ricordare che questo agar non è completamente selettivo per gli stafilococchi e quindi bisogna confermarne la presenza con uno striscio batterioscopico colorato al Gram [► FOTO].

Nelle urine lo *Staphylococcus aureus* è di raro riscontro. Su terreno cromogenico si presenta in colonie grandi, giallastre [► FOTO].

Recentemente è stato introdotto in commercio un terreno selettivo che permette la crescita e l'immediato riconoscimento dei ceppi meticillino resistenti (MRSA). Sono impiegati due terreni nella stessa piastra: da una parte il terreno selettivo in blu e dall'altra l'agar sale mannite [► FOTO].

Identificazione

Sono catalasi positivi.

È sufficiente il test della coagulasi basato sulla capacità di questo stafilococco di coagulare il plasma citrato di coniglio, che avviene in genere entro 4 ore dall'incubazione a 37 °C (0,1 ml di una coltura in brodo cuore cervello di una notte e 0,5 ml di plasma di coniglio), ma può richiedere anche 24 ore per alcuni ceppi particolarmente lenti. In alternativa si può impiegare una grossa colonia isolata su agar non selettivo, trasferita in una provetta contenente 0,5 ml di plasma di coniglio ed incubata come sopra. Il test è positivo se si osserva la formazione di un coagulo, anche modesto, che si nota meglio inclinando o rovesciando la provetta [► FOTO].

Solo lo *Staphylococcus aureus*, tra i patogeni dell'uomo, è positivo a questo test, mentre con il test su vetrino, che evidenzia il clumping factor, circa il 10-15% dei ceppi possono dare risultati negativi, come possono risultare positivi lo *S. lugdunensis* e *S. schleiferi*; non impiegare colonie isolate su agar con alte concentrazioni di sale (agar sale mannite) perché possono dare risultati falsamente positivi per autoagglutinazione.

Molto validi i nuovi test su vetrino (tipo Pastorex Staph-Plus®) perché sono in grado di evidenziare anche i ceppi meticillino resistenti. Comunque nel sospetto di trovarci di fronte ad uno *Staphylococcus aureus* il test su vetrino negativo deve essere confermato con quello in provetta della coagulasi.

I vari sistemi commerciali manuali o automatizzati sono molto validi per l'identificazione del microrganismo

Antibiogramma

Non esistono particolari problemi per il saggio per i ceppi meticillino sensibili, mentre maggiori difficoltà s'incontrano con i ceppi resistenti perché, sia il Kirby-Bauer sia i sistemi automatici, possono dare risposte non corrette proprio nell'evidenziare la resi-

stenza a quest'antibiotico. È invece molto importante conoscere la sensibilità o meno del ceppo alla meticillina (in pratica si preferisce il saggio con l'oxacillina perché più stabile della meticillina e dà risultati più attendibili nel rilevare i ceppi eteroresistenti) perché predice la sensibilità a tutti gli antibiotici β -lattamici, alcuni dei quali possono anche risultare attivi *in vitro* ma non devono comunque essere impiegati se il ceppo risulta resistente alla meticillina. Effettuare la lettura della piastra a luce trasmessa per valutare la presenza di una qualunque crescita all'interno dell'alone d'inibizione del disco di oxacillina.

Se si ottengono risultati intermedi bisogna eseguire il test di screening con oxacillina sale agar [► FOTO] (si possono usare anche piastre pronte del commercio). Nell'attesa di tecniche più affidabili (identificazione del genotipo con test di biologia molecolare), bisogna seguire scrupolosamente le direttive del NCCLS (utilizzare terreno con più alta concentrazione salina e più bassa temperatura d'incubazione per almeno 24 ore) per non incorrere in grossolani errori d'interpretazione che potrebbero avere gravi ripercussioni sulla salute del paziente.

Problemi simili s'incontrano anche per saggiare la sensibilità ai glicopeptidi sia con il classico Kirby-Bauer, sia con i sistemi automatici perciò è necessario attenersi a quanto indicato nelle linee guida del NCCLS.

Tutti gli stafilococchi con un diametro dell'alone d'inibizione alla vancomicina uguale o inferiore a 14 mm devono essere testati con un metodo MIC e quelli veramente resistenti, al momento estremamente rari, debbono essere inviati in un Centro di riferimento per la conferma della resistenza.

Coloro che impiegano sistemi automatizzati debbono assicurarsi che il software dello strumento mascheri direttamente le risposte: gli strumenti più moderni (Vitex®, Phoenix®) provvedono in automatico in quanto possiedono regole o un sistema esperto che interviene quando è riconosciuto un ceppo meticillino resistente ed indica come resistenti tutti gli antibiotici β -lattamici, anche se riconosciuti attivi *in vitro*.

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis è uno stafilococco coagulasi negativo (CoNS) e tra questi è sicuramente quello che si isola con maggiore frequenza da materiali biologici inviati in laboratorio per l'esame colturale, sia in casi di vera infezione, sia come contaminante. È ampiamente diffuso nell'ambiente esterno; nell'uomo si ritrova soprattutto sulla cute e sulle mucose. Per questo motivo risulta spesso difficile stabilire la reale responsabilità del microrganismo in un certo quadro infettivo ed è quindi fondamentale una collaborazione con il clinico per cercare di chiarire il problema.

I criteri utili per considerare patogeno il ceppo isolato sono:

- a) isolamento in coltura pura
- b) isolamento in carica elevata
- c) isolamento ripetuto dello stesso ceppo nel corso dell'infezione dallo stesso campione.

È stato isolato come patogeno in numerosi casi di batteriemia, endocardite, infezioni di ferite chirurgiche ed infezioni del tratto urinario, nel liquido cerebro-spinale,

nei materiali protesici e nelle infezioni correlate a dialisi peritoneale ed a cateteri intravascolari.

È in genere più resistente agli antibiotici dello *Staphylococcus aureus*.

Isolamento

Non pone particolari problemi in quanto i ceppi crescono bene su tutti i normali terreni di coltura specie contenenti sangue, nei quali la crescita è abbondante e rapida con colonie grandi, bianco-grigiastre non emolitiche [► FOTO].

Alcuni stipiti possono produrre slime, un materiale di natura glico-proteica che permette l'adesione su varie tipologie di superfici.

Si isola frequentemente anche da campioni urinari dove spesso è un contaminante, talora anche con cariche alte. Sul terreno cromogenico le colonie sono grandi, biancastre [► FOTO].

Identificazione

Si esegue solo per gli stipiti ritenuti patogeni e si impiegano i vari sistemi commerciali con buoni risultati. Per gli altri ceppi ci si può limitare a referarli come “coagulasi negativi”. Su agar sale mannite il terreno vira dal rosa al violetto [► FOTO].

Antibiogramma

È obbligatorio perché la maggior parte dei ceppi risulta resistente oltre che alla meticillina anche a molti antibiotici specifici per i Gram positivi e stanno emergendo resistenze anche ai glicopeptidi (teicoplanina in particolare).

L'antibiogramma si esegue su agar Mueller-Hinton senza aggiunta di sangue. Ricordare che le nuove indicazioni NCCLS propongono differenti *break-points* per l'oxacillina distinti per *S. aureus* e CoNS:

Antibiotico	Disco	Zona diametro in mm.			Equivalente MIC		Specie
		R	I	S	break-point (µg/ml)		
					R	S	
Oxacillina	1 µg	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2	<i>S. aureus</i>
Oxacillina	1 µg	≤ 17	—	≥ 18	≥ 0,5	≤ 0,25	CoNS

Il test di screening con oxacillina non si applica a tutti gli stafilococchi coagulasi negativi (CoNS).

Staphylococcus saprophyticus

Questo stafilococco causa principalmente infezioni dell'apparato urinario, in particolare in donne giovani non ricoverate (anche in carica bassa: 1.000-10.000 ufc/ml),

mentre nel maschio può causare uretrite e prostatite. È raramente isolato in ambiente ospedaliero.

Isolamento

L'isolamento è facile sui vari terreni di coltura specifici per stafilococchi (agar sangue, agar sale mannite, ecc.), ma la crescita è buona anche sui nuovi terreni cromogenici per la coltura di campioni urinari e su agar CLED.

Morfologia delle colonie

Su agar sangue le colonie sono larghe (5-8 mm di diametro), opache, lisce, di consistenza burrosa e più convesse delle altre specie di stafilococchi; circa la metà degli stipiti sono pigmentati con un colore che può variare dal giallo crema al giallo-arancio.

Nella foto, ottenuta da una coltura di urina su CPSID® (Biomérieux), il batterio si presenta in colonie gialle insieme a colonie di enterococchi (colonie celesti più piccole) ed ad una flora mista Gram positiva [►► FOTO].

Identificazione

È eseguita con sistemi pronti del commercio che danno buoni risultati. Da ricordare la negatività alla reazione dei nitrati e la resistenza alla novobiocina.

Antibiogramma

Si esegue con le normali tecniche in uso.

Staphylococcus haemolyticus

Si riscontra in particolare in campioni biologici di pazienti ospedalizzati dove rappresenta la seconda specie di stafilococco coagulasi negativa più frequentemente isolata dopo lo *S. epidermidis*. Può causare setticemia, endocardite, infezioni urinarie e delle ferite chirurgiche ed è associato spesso ad infezioni da catetere venoso centrale.

Isolamento

L'isolamento è facile sui vari terreni di coltura specifici per stafilococchi (agar sangue, agar sale mannite, ecc.).

Morfologia delle colonie

Le colonie sono larghe, più grandi di quelle di *Staphylococcus epidermidis*, con talora un'alone di emolisi su agar sangue che si evidenzia meglio dopo 48 ore di incubazione.

Identificazione

È eseguita con sistemi pronti del commercio che danno buoni risultati.

Antibiogramma

Si esegue con le normali tecniche in uso.

Staphylococcus hominis

Non si isola frequentemente nei campioni clinici.

Le colonie sono grandi (5-9 mm) lisce, burrose e opache, non pigmentate o colorate dal crema all'arancio-giallo.

Staphylococcus lugdunensis

Si isola con una frequenza maggiore da qualche tempo ed è considerato responsabile d'infezioni a carico di protesi di vario tipo, ascessi cerebrali, osteoartriti croniche, infezioni dei tessuti molli, cateteri, setticemie. Le colonie sono simili a quelle dello *S. hominis*. Il germe può dare una reazione positiva o debole nella ricerca del *clumping factor* e quindi potrebbe indurre a far pensare ad uno *S. aureus*. Pertanto è opportuno eseguire il test della coagulasi con plasma umano che dà un risultato negativo.

Capitolo V

Cocchi Gram negativi

Neisseriaceae

Le specie del genere *Neisseria*, insieme a *Moraxella*, *Acinetobacter* e *Kingella* appartengono alla famiglia delle *Neisseriaceae*.

Le specie di *Neisseria* coinvolte in infezioni dell'uomo sono quasi esclusivamente *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*, mentre le altre specie sono di norma non patogene e costituiscono parte della flora residente sulle mucose dell'oro e naso-faringe.

Mentre *N. meningitidis* può essere ritrovata, in soggetti asintomatici, come colonizzante nei distretti oro e naso faringei e sulle mucose ano-genitali prevalentemente in omosessuali, *N. gonorrhoeae* deve essere sempre considerata come un vero patogeno in qualunque sede avvenga il suo isolamento.

Si presentano alla colorazione di Gram come cocchi disposti prevalentemente a diploidi, spesso con la caratteristica forma "a chicco di caffè", Gram negativi. Sono immobili ed ossidasi positivi. Producono acido dai carboidrati per via ossidativa e non fermentativa.

Le specie patogene necessitano per la crescita di terreni arricchiti (agar cioccolato) e preferiscono un'atmosfera con CO₂ e ricca di umidità. Nei terreni di coltura la vitalità dei ceppi non si mantiene più di quattro giorni per cui è necessario ritrapiantarle in terreno fresco con regolarità o usare altri mezzi di conservazione (liofilizzazione).

Neisseria meningitidis

Neisseria meningitidis può colonizzare l'oro e naso-faringe e comportarsi come non patogeno nei soggetti portatori e può colonizzare la mucosa del tratto anogenitale, in particolare in soggetti omosessuali.

La ricerca della *N. meningitidis* viene spesso eseguita proprio per identificare i portatori sani nell'oro e naso-faringe, dove la colonizzazione può persistere per alcune settimane o mesi, più facilmente in soggetti che vivono in comunità chiuse o confinate (scuole, caserme).

Isolamento

La ricerca viene di solito fatta sul liquor cerebro-spinale, ma può essere eseguita anche dal sangue e da altre sedi in cui è presente una flora commensale (mucose faringee e ano-genitali).

Il germe è estremamente sensibile alla temperatura ed all'essiccamento per cui i campioni biologici debbono essere seminati quanto prima dopo il prelievo per prevenire una sovracrescita della flora batterica commensale, se presente, e comunque non devono essere conservati in frigorifero.

La resa è migliore da tamponi naso-faringei piuttosto che oro-faringei.

Per ottenerne la crescita e l'isolamento è sufficiente l'impiego di un agar al cioccolato con aggiunta di Polivitalax®, ma da materiali provenienti da sedi anatomiche colonizzate da una flora residente si impiega il terreno selettivo di Thayer-Martin (o simili) contenente vari antibiotici, cui è sempre bene associare anche un agar cioccolato non selettivo o un agar sangue.

Prima di procedere alla semina sulle piastre è opportuno toglierle dal frigorifero e porle in termostato per almeno 20 minuti per evitare al batterio possibili shock termici.

I terreni debbono essere incubati a 35-37 °C per 24-72 ore in presenza di CO₂ ottenibile con il metodo della candela o con l'impiego di sistemi commerciali (giare con buste per CO₂).

Su *liquor*, oltre alla coltura, può essere ricercato anche l'antigene solubile per una diagnosi rapida di meningite utilizzando uno dei vari kit del commercio; è opportuno ricordare che non sempre è possibile osservare il meningococco nel liquor con la colorazione di Gram e che le cellule batteriche possono riscontrarsi all'interno ma anche all'esterno del citoplasma dei polimorfonucleati [► FOTO].

Morfologia delle colonie

Le colonie sono tipicamente trasparenti (1-2 mm di diametro) su agar cioccolato, piatte, mentre quelle di alcuni sierogruppi (A e C) possono essere mucoidi. La colorazione di Gram dimostra dei cocchi a diploidi Gram negativi dalla caratteristica forma a chicco di caffè, che si modificano nelle colture più vecchie per diventare a cocchi.

Identificazione

– Da coltura

Un'identificazione presuntiva si fa usando il test dell'ossidasi (positivo entro pochi secondi) e della catalasi (positiva). La conferma si può fare con vari kit del commercio che evidenziano la fermentazione degli zuccheri (positivi il glucosio ed il maltosio). La maggior parte dei ceppi non cresce su agar nutriente. La conferma definitiva deve essere eseguita con antisieri specifici polivalenti e/o monovalenti per individuare il gruppo di appartenenza del ceppo isolato, importante ai fini epidemiologici (i ceppi A e C sono quelli maggiormente interessati in casi epidemici, il B più spesso in casi isolati). Per ragioni di sicurezza la sospensione batterica deve essere fatta in fisiologica con formalina, altrimenti operare con attenzione sotto cappa a flusso laminare verticale di classe II.

Eseguire sempre un controllo per verificare se il ceppo autoagglutina in fisiologica ed osservare se si ha agglutinazione con più antisieri; in tal caso il ceppo è classificato come non gruppabile. È consigliabile comunque inviare il ceppo ad un centro di riferimento (Istituto Superiore di Sanità a Roma).

– Da liquor cefalo rachidiano

In caso di meningite causata da meningococco può essere eseguito, oltre ad uno striscio batterioscopico da colorare al Gram, anche una ricerca diretta impiegando kit commerciali che evidenziano l'antigene dei vari sierogruppi del germe grazie ad

un anticorpo polivalente (test al lattice o coagulazione). Il test deve essere sempre eseguito in parallelo all'esame colturale e batterioscopico ricordando che un risultato negativo non esclude l'infezione da meningococco.

Antibiogramma

L'NCCLS non consiglia l'esecuzione dell'antibiogramma di routine ed inoltre il test della diffusione con i dischi non è affidabile per l'utilizzo nella pratica clinica.

Si deve eseguire con la tecnica della microdiluizione in brodo usando terreno di Mueller-Hinton aggiustato per i cationi con sangue di cavallo lisato o con la tecnica dell'agar diluizione in agar Mueller-Hinton e 5% di sangue di pecora. Può essere usato anche l'E-Test®.

Mancano le interpretazioni dei valori delle MIC, ma è possibile usare quelle proposte per lo *Streptococcus pneumoniae* per penicillina e cefalosporine.

Gli antibiotici da impiegare nel saggio sono i seguenti: penicillina, tetraciclina, cloramfenicolo, ed una cefalosporina a spettro allargato (ceftriaxone, cefotaxime, cefoperazone).

Rifampicina, minociclina e ciprofloxacina sono antibiotici impiegati prevalentemente per la chemioprolifassi.

Neisseria gonorrhoeae

Neisseria gonorrhoeae è stato uno dei più importanti patogeni causa di malattie infettive trasmesse per via sessuale (contato diretto), ma era anche responsabile d'infezioni materno fetali (congiuntiviti) al momento del parto. Queste patologie sono fortemente diminuite grazie alla maggiore attenzione ai comportamenti sessuali, ma anche alla paura di contrarre, per la stessa via, il virus HIV. Tuttavia la trasmissione interumana è mantenuta in gran parte dai soggetti asintomatici.

Nelle donne il gonococco può causare, per via ascendente da un'infezione endocervicale, una PID (malattia infiammatoria pelvica) che può produrre sterilità, in contemporanea o meno ad un'infezione da *Chlamydia trachomatis* che spesso è copresente al gonococco e trasmessa durante l'atto sessuale.

Di norma le infezioni genitali si limitano appunto all'apparato genitale maschile e femminile, ma in una piccola percentuale di casi (< 3%) si può avere passaggio del gonococco nel circolo sanguigno con conseguente batteriemia.

Fortunatamente il batterio ha una scarsa capacità di sopravvivenza al di fuori dell'organismo umano risentendo in modo particolarmente negativo dell'essiccamento e delle basse o alte temperature.

A seguito di pratiche sessuali può causare infezioni sintomatiche o asintomatiche nell'oro-faringe e nella mucosa del tratto anogenitale.

Isolamento

La ricerca viene eseguita da vari materiali del tratto urogenitale compresa l'urina, ma anche dalla congiuntiva o dal faringe, da fluidi articolari e dal sangue.

Nelle donne sessualmente attive il prelievo deve essere eseguito in sede endocervicale mentre nelle prepuberi si può eseguire un tampone nel fornice posteriore (se possibile) o direttamente dall'orificio vaginale. I campioni prelevati dall'uretra dovrebbero essere raccolti almeno dopo un'ora dall'ultima minzione.

Il sangue deve essere seminato in flaconi di coltura sprovvisti di SPS (sodio polietanolsulfonato) perché questa sostanza può essere tossica per il batterio.

Se è presente una sufficiente quantità di materiale è sempre opportuno preparare anche uno striscio batterioscopico da colorare al Gram per osservare la presenza dei tipici cocchi a chicco di caffè in sede intracitoplasmatica. Tuttavia se lo striscio del materiale è stato fatto male (strisciato invece che ruotato sul vetrino) si possono osservare numerosi cocchi in sede extracellulare per rottura del citoplasma dei polimorfionucleati [► FOTO].

Il metodo migliore per conservare la vitalità del germe è la semina diretta del campione dopo il prelievo, ma se questo non è possibile si possono inserire i tamponi nel terreno di trasporto di Stuart avendo però l'avvertenza di procedere alla semina subito dopo l'arrivo in laboratorio.

Prima di procedere alla semina sulle piastre è opportuno toglierle dal frigorifero e porle in termostato per almeno 20 minuti per evitare al batterio possibili shock termici.

Per la coltura si impiega il terreno di Thayer-Martin (o simili) contenente vari antibiotici per ridurre o sopprimere la flora batterica associata; è sempre bene aggiungere anche un agar cioccolato non selettivo in quanto sono stati segnalati ceppi sensibili agli antibiotici usati nel terreno selettivo.

I terreni debbono essere incubati a 35-37 °C per 24-72 ore in presenza di CO₂ ottenibile con il metodo della candela o con l'impiego di sistemi commerciali (buste o giare).

Morfologia delle colonie

Le colonie sono tipicamente trasparenti (0,5-1 mm di diametro), più piccole di quelle del meningococco su agar cioccolato [► FOTO]. La colorazione di Gram dimostra dei cocchi a diploidi Gram negativi dalla caratteristica forma a chicco di caffè, che si modifica nelle colture più vecchie per diventare a cocco.

Antibiogramma

È obbligatorio farlo a causa della crescente quantità di stipiti resistenti alla penicillina che era il farmaco di scelta per la terapia: per questo motivo è bene eseguire sempre anche un test per verificare la produzione di β-lattamasi da parte del ceppo isolato usando un disco di nitrocefina: se positivo indica resistenza del ceppo a penicillina, ampicillina ed amoxicillina.

Oltre alla resistenza causata da produzione di β-lattamasi mediata da plasmidi esiste anche una resistenza cromosomica che determina una modifica delle PBPs, ma entrambi questi meccanismi non interferiscono con l'attività antibatterica delle cefalosporine ad ampio spettro (quali ceftriaxone o cefixime) che restano comunque attivi.

Anche la tetraciclina può presentare una resistenza di tipo plasmidico o cromosomico.

I chinolonici sono di norma attivi, tranne in alcune aree geografiche, come nel Sud-est asiatico, dove sono invece molto alte le resistenze.

L'NCCLS non raccomanda l'antibiogramma di routine ma può essere fatto anche a fini epidemiologici e che viene eseguito con il metodo di Kirby-Bauer su piastre di agar al cioccolato fatto con agar base GC ed aggiunta di 1% di supplemento di crescita, incubato per 24 ore in CO₂.

Utilizzare un ceppo di conferma ATCC 49226, come controllo di qualità interno per verificare la performance del terreno usato in routine secondo gli standard dell'NCCLS.

Gli antibiotici da impiegare nel saggio sono i seguenti: penicillina, tetraciclina, ed una cefalosporina a spettro allargato (ceftriaxone, cefotaxime), un fluorochinolone (esempio ciprofloxacina). L'inoculo deve essere eseguito con diluizione dello stipite in brodo, standardizzazione ed immediata semina su piastra in quanto il germe si può lisare.

I ceppi che presentano un alone d'inibizione < 19 mm con un disco di penicillina da 10 unità sono verosimilmente produttori di β-lattamasi ed indicano una resistenza plasmidica, ma debbono essere comunque confermati con il disco di nitrocefina.

I ceppi che presentano un alone d'inibizione < 19 mm con un disco di tetraciclina da 30 µg devono essere confermati con un test di diluizione in agar (deve dare una risposta di MIC ≥ 16 µg/mL).

Moraxella catarrhalis

Questo microrganismo è stato riconosciuto responsabile di infezioni umane in quadri clinici chiaramente documentati solo negli ultimi 15 anni: può causare infezioni acute localizzate, quali otite media, sinusite o broncopolmonite, ma anche infezioni sistemiche molto gravi, quali endocarditi o meningiti.

Insieme a *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* rappresenta il più importante patogeno ritrovato nelle broncopolmoniti acquisite in comunità, in particolare in pazienti anziani.

Può essere un costituente della flora normale del nasofaringe e delle alte vie respiratorie sedi da cui il microrganismo si diffonde per contiguità, ma meno frequentemente colonizza l'orofaringe.

Alla colorazione di Gram si presenta come diplococco Gram negativo.

Isolamento

L'osservazione del materiale biologico strisciato su vetrino colorato al Gram è molto indicativa se sono presenti in numero predominante rispetto alla flora associata.

La coltura si esegue seminando i materiali biologici su agar sangue di montone al 5% o su agar cioccolato. La crescita è abbondante e spesso il ceppo si ritrova in coltura quasi pura.

È preferibile l'incubazione in termostato a 35 °C con 5% di CO₂ per 24 ore.

Ricordare che questo microrganismo non cresce in terreni selettivi, come l'agar sangue CNA o l'agar cioccolato addizionato di bacitracina.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono in genere rosate scure su agar cioccolato, lisce, con margini regolari e si presentano di consistenza friabile; se spinte con un'ansa tendono a rimanere intatte ed a scivolare sulla superficie dell'agar come un disco di hockey su ghiaccio [►► FOTO].

Identificazione

Dal punto di vista metabolico sono ossidasi e catalasi positive. Non producono acido dai carboidrati e, uniche tra le *Neisseriae*, sono Dnasi positive. Esistono in commercio sistemi per l'identificazione rapida del ceppo isolato.

Antibiogramma

Sono diventate resistenti alle penicilline per produzione di forti quantità di β -lattamasi per cui è opportuno eseguire un test al "nitrocefina®" per riconoscere i ceppi produttori.

Nella foto nel disco a sinistra la reazione positiva (rosa) di un ceppo produttore di β -lattamasi ed a destra la reazione negativa (gialla) di un ceppo non produttore [►► FOTO].

L'NCCLS non ha validato un test per l'esecuzione dell'antibiogramma con questo batterio.

L'antibiogramma si può eseguire su agar Mueller-Hinton, inserendo cefalosporine, penicilline stabili alle β -lattamasi, tetraciclina, trimetoprim/sulfametossazolo e chinolonici, ma indicando chiaramente al clinico che non esistono interpretazioni approvate dei risultati ottenuti in vitro.

Capitolo VI

Bacilli Gram positivi aerobi

Listeria

Il genere *Listeria* comprende batteri Gram positivi a forma di coccobacillo [► FOTO], asporigeni, che si presentano singoli o in corte catene, oppure in forma di lunghi filamenti nelle colture vecchie o di tipo rugoso; sono mobili a temperatura ambiente ma debolmente mobili a 37 °C [► FOTO]. La crescita avviene anche a 4 °C e questa caratteristica può costituire un metodo selettivo naturale. Sono anaerobi facoltativi.

Le listerie sono ampiamente distribuite in natura, si possono ritrovare negli alimenti, (che talora possono causare episodi epidemici per trasmissione diretta all'uomo), ma anche in portatori umani o animali asintomatici.

Listeria monocytogenes è la specie più importante come causa d'infezioni nell'uomo (meningite, encefalite e setticemia specie in soggetti immunodepressi). Nelle donne in gravidanza *L. monocytogenes* può dare un'infezione simile all'influenza con batteriemia che può provocare seri danni al feto, fino alla morte. La diagnosi può essere ottenuta da un'emocoltura eseguita precocemente nella donna o dal liquor, sangue, liquido amniotico o cute del neonato.

Isolamento

Si ottiene una buona crescita su agar sangue di montone al 5% incubando in aria o, meglio, in CO₂. I campioni clinici provenienti da siti non sterili debbono essere seminati in terreni selettivi o incubati in frigorifero (arricchimento a freddo) in brodo comune, da cui fare periodicamente subculture in agar sangue o terreni selettivi.

Morfologia delle colonie

Le colonie di *L. monocytogenes* sono piccole con una stretta zona di β-emolisi. Alcune specie non sono emolitiche [► FOTO].

Sono fortemente catalasi positive ed ossidasi negative.

Identificazione

La crescita di colonie piccole, β-emolitiche, catalasi positive, ossidasi negative che evidenziano corti coccobacilli Gram positivi, mobili a temperatura ambiente, è fortemente suggestiva di *Listeria monocytogenes*. L'identificazione definitiva può essere ottenuta con alcuni sistemi commerciali (ad esempio API Coryne®).

I ceppi sono positivi alla prova del CAMP test che si esegue seminando una striscia di un ceppo di *Staphylococcus aureus* produttore di β-lisina e, perpendicolarmente ad essa, a circa 3-4 mm, una striscia del ceppo sospetto, di un enterococco (campione negativo) e di una listeria (ceppo positivo). Al contatto tra le due righe la listeria

produce un potenziamento dell'emolisi che si evidenzia sotto forma di una punta di freccia [►► FOTO].

Antibiogramma

L'NCCLS consiglia una metodica di microdiluzione in brodo in terreno Mueller-Hinton broth cationi-aggiustato addizionato di sangue lisato di cavallo (2-5% v/v) e incubazione a 35-37 °C per 16-20 ore: Antibiotici da saggiare: penicillina, ampicillina.

Il pattern di suscettibilità e resistenza agli antimicrobici di *L. monocytogenes* è risultato relativamente stabile per molti anni.

Genere *Bacillus*

Questo genere appartiene alla più vasta famiglia delle *Bacillaceae* in cui confluiscono un vasto numero di batteri che producono spore, sia aerobi sia anaerobi facoltativi, ampiamente diffusi nell'ambiente e, tranne rare eccezioni, non patogeni di norma per l'uomo.

Si presentano sotto forma di elementi bastoncellari tozzi, Gram positivi ma tendenti al Gram negativo nelle colture più vecchie.

Sono mobili, ad eccezione di *Bacillus anthracis*, catalasi positivi e questa reazione li differenzia bene dal genere *Clostridium* che invece sono negativi.

Proprio a causa della loro grande diffusione in natura possono creare problemi interpretativi quando si isolano da campioni di norma sterili come da emocolture: in questi casi è doveroso un contatto con il clinico per definirne l'eventuale ruolo patogeno nel caso in oggetto.

Le specie patogene per l'uomo sono: *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*. In rare occasioni ed in soggetti particolari sono stati isolati altri bacilli, in particolare *Bacillus subtilis*.

Bacillus anthracis

È tornato prepotentemente all'attenzione dei microbiologi a causa degli episodi di bioterrorismo provocati negli Stati Uniti con l'invio di lettere o piccoli pacchetti postali contaminati da colture liofilizzate del batterio.

Causa principalmente una malattia grave negli erbivori e da questi può passare all'uomo per contatto diretto o indiretto con gli animali infetti che eliminano grandi quantità di spore che riescono a sopravvivere per molti anni nell'ambiente contaminato.

La malattia dell'uomo è di solito limitata alla cute (pustola maligna) ma esistono anche forme intestinali, polmonari e meningiti secondarie alle forme cutanee.

Si presenta in forma di grossi bastoncelli Gram positivi (1-1,5 × 3-5 μm).

Le spore si osservano solo in campioni biologici che sono esposti a basse concentrazioni di CO₂, come quelle presenti nell'aria ambientale: sono di forma ovale in posizione sub-terminale nella cellula, senza provocarne un ingrandimento.

Isolamento

Il germe cresce bene e rapidamente su agar sangue.

Non esistono difficoltà nell'isolamento da materiali di norma sterili mentre per campioni biologici provenienti da sedi con flora residente può essere utile sottoporre il campione ad uno shock termico diluendolo con acqua distillata sterile (in rapporto 1:1) e tenendolo per 15 minuti a 62 °C.

Per motivi di sicurezza è opportuno maneggiare i campioni biologici e le relative colture sotto cappa a flusso laminare verticale.

Nel caso si identifichi una colonia che presenta le caratteristiche del *Bacillus anthracis* è opportuno inviare il ceppo in un centro di riferimento per avere la conferma attraverso metodi di biologia molecolare.

Morfologia delle colonie

Su agar sangue le colonie sono grandi (2-5 mm), biancastre o grigiastre, non emolitiche, piatte, irregolari (a “caput medusae”), con aspetto a vetro smerigliato, attaccate all'agar.

L'identificazione biochimica può essere eseguita impiegando il kit API 50CH® della Biomérieux, l'unico sistema commerciale al momento disponibile, ma non raccomandabile nella routine. I ceppi sospetti debbono essere comunque inviati in un centro di riferimento per la conferma di specie.

Antibiogramma

Non è necessario eseguire l'antibiogramma in quanto i ceppi isolati dall'uomo sono quasi costantemente sensibili alla penicillina.

Bacillus cereus

È un batterio, ampiamente diffuso nell'ambiente, che causa tossinfezioni alimentari quando introdotto nell'intestino per ingestione di cibi di varia natura (carni, vegetali, dolci, salse, latte), provocando una forma diarroica (con dolori addominali dopo 8-16 ore) ed una forma emetica (nausea e vomito dopo 1-5 ore dall'assunzione del cibo contaminato).

Infatti le spore possono sopravvivere alla cottura ed in condizioni di conservazione non corretta germinano producendo la tossina causa dei disturbi intestinali (due diverse tossine causa delle differenti sindromi diarroiche).

Può anche provocare numerose altre infezioni (polmoniti, meningiti, endocarditi, osteomieliti, peritoniti, ma anche infezioni dell'orecchio e dell'occhio molto gravi).

Isolamento

Il germe cresce bene e rapidamente su agar sangue con colonie circondate da un'area di β -emolisi, leggermente verdastre, opache “a vetro smerigliato” [► FOTO]. È mobile.

La coltura si può eseguire da campioni biologici o da alimenti contaminati dalle spore.

Oltre all'agar sangue può essere impiegato come terreno selettivo l'agar PEA (contenente alcool feniletilico).

Actinomiceti aerobi

Sono bastoncelli aerobi, Gram positivi di forma irregolare, spesso in filamenti più o meno lunghi e ramificati, talora ritrovati in piccoli ammassi di cellule singole e corte.

A questo gruppo appartengono vari generi di cui importanti clinicamente sono: *Nocardia* e *Rhodococcus*, ma anche *Corynebacterium* e *Mycobacterium* che sono trattati a parte.

Sono ampiamente diffusi in natura e nell'uomo possono far parte della flora residente di alcuni distretti corporei, ma possono anche essere veri patogeni.

Corynebacterium

Si tratta di un genere di batteri che hanno avuto negli anni numerose modifiche tassonomiche e che comprende organismi Gram positivi a morfologia variabile ma fondamentalmente a bastoncello diritto o leggermente incurvato o a "clava", disposto singolarmente, in ammassi, a "palizzata" o a "lettere cinesi", o appaiato a forma di "V" [► FOTO].

Non si colorano con la colorazione di Ziehl-Neelsen e non formano elementi allungati, in ciò distinguendosi nettamente dagli *Actinomycetes* e dalle *Nocardiae*.

Alla colorazione di Gram sono positivi (si colorano in violetto), ma si possono presentare anche parzialmente decolorati.

Di norma sono catalasi positivi e non mobili.

Si ritrovano prevalentemente sulla pelle dell'uomo, ma anche sulle mucose, e nell'intestino anche di mammiferi ed altri animali.

Corynebacterium diphtheriae

È la specie più patogena per l'uomo in quanto può causare la difterite, malattia molto grave e talora mortale in epoca pre vaccinale ma praticamente scomparsa, almeno nel nostro Paese e nell'Europa centro-settentrionale, dopo l'introduzione della vaccinazione di massa con l'anatossina. Da qualche anno c'è stata una ripresa della difterite in alcuni stati dell'ex Unione Sovietica dove ha causato anche un certo numero di morti.

Si ritrova prevalentemente dalle lesioni cutanee e dal naso faringe delle persone infette che hanno sviluppato la malattia (difterite). La gravità della difterite dipende dalla produzione o meno della esotossina da parte del ceppo infettante la cui ricerca si esegue con tecniche che, di solito, non sono fatte nei normali laboratori di microbiologia, come la prova in vivo su cavia o la prova in vitro di Elek.

Isolamento

Si esegue da tampone naso-faringeo o da lesione cutanea seminandolo su terreni arricchiti (terreno di Loeffler, agar sangue, agar cistina-tellurito, terreno di Tinsdale), ma è meglio usare in contemporanea agar a becco di clarino di Loeffler e agar al tellurito, che è al tempo stesso un terreno selettivo e differenziale [► FOTO].

Questi terreni di coltura hanno una durata limitata nel tempo per cui è difficile averli a disposizione nel momento del bisogno in quanto le richieste per la ricerca del batterio difterico sono molto rare.

L'incubazione avviene in termostato a 37 °C in aria.

Antibiogramma

Di norma non si esegue. L'NCCLS non ha prodotto criteri interpretativi delle MIC.

Gli antibiotici elettivi (penicillina ed eritromicina), eliminando i batteri, impediscono la formazione di nuova tossina e riescono a bonificare i soggetti portatori e quindi a ridurre o fermare l'episodio epidemico.

Batteri corineformi (difteroidi)

Oltre il *Corynebacterium diphtheriae*, esistono altre specie isolate da materiali biologici umani ed le più comuni sono: *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. jeikeium*, *C. ulcerans*.

C. ulcerans si può isolare da faringo tonsilliti, *C. jeikeium* da emocolture, da infezioni cutanee e dei tessuti molli, da polmoniti, peritoniti, specie da pazienti defedati o trattati per molto tempo con antibiotici. *C. urealyticum* è stato isolato da infezioni urinarie.

Nella maggior parte dei casi sono da considerare come contaminanti, in quanto fanno parte della flora residente del sito da cui è stato prelevato il campione biologico inviato in laboratorio per l'esame colturale; talora invece sono veri patogeni e come tali debbono essere considerati in varie situazioni cliniche che comunque debbono essere attentamente valutate e che talora impongono la ripetizione della coltura di un altro campione per confermare questa ipotesi.

Isolamento

La maggior parte delle specie cresce bene su terreni al sangue e senza necessità di incubazione in CO₂.

Le colonie sono grandi, bianco grigiastre, spesso irregolari e di consistenza cerosa [►► FOTO].

Identificazione

La corretta identificazione biochimica dei corinebatteri può essere fatta impiegando un test del commercio: API Coryne®, anche se non è sempre agevole individuare la specie isolata e può essere sufficiente riconoscere l'appartenenza al gruppo impiegando alcune semplici reazioni ed aiutandoci con la morfologia evidenziata con la colorazione di Gram.

Il batteriologo dovrà attentamente valutare il risultato dell'esame colturale prendendo in considerazione la crescita del ceppo: se in coltura pura o mista ed il numero delle colonie in relazione a quelle di altri batteri isolati dal campione esaminato.

Antibiogramma

Non si esegue di norma. Sono sempre sensibili alla vancomicina.

Arcanobacterium haemolyticum

Si isola da tamponi faringei in soggetti giovani, ma anche da sangue in soggetti con endocardite, o con osteomielite. Nelle due foto sono visibili le caratteristiche delle colonie su agar sangue ed agar cioccolato [► FOTO].

Alla colorazione di Gram il microorganismo appare come un difterioide, con elementi coccoidi tipo streptococchi.

Nocardia

Sono batteri aerobi, Gram positivi, che si presentano in forma filamentosa e che si possono frammentare in forme irregolari di bastoncelli o cocchi. Sono catalasi positivi, immobili che si colorano parzialmente con la colorazione per gli organismi alcalo-resistenti.

Sono ampiamente diffusi nell'ambiente: la specie *N. asteroides* è più diffusa nelle regioni a clima temperato mentre *N. brasiliensis* si ritrova più frequentemente nelle aree subtropicali o tropicali.

Possono causare infezioni localizzate (cutanee, subcutanee e linfocutanee) o diffuse con coinvolgimento in prevalenza di polmoni e cervello, potendo comunque interessare ogni organo interno.

I campioni ottimali per la ricerca sono: il broncolavaggio per le infezioni polmonari, l'emocoltura per le forme setticemiche, ricordando di incubare i flaconi per almeno 2 settimane, il liquor per le forme cerebrali, ricordando di non scartare le colture prima di 4 settimane dalla semina. I campioni prelevati non devono essere posti in frigorifero perché alcuni ceppi possono venire danneggiati dal freddo. In lesioni cutanee si possono osservare i micetomi da cui possiamo prelevare del materiale caseoso che può contenere i tipici granuli.

Esistono una decina di specie diverse anche se la più comune è la *N. asteroides*.

Poiché le nocardie sono raramente riscontrati come contaminanti nell'uomo, la loro presenza in campioni biologici inviati per la coltura deve essere sempre segnalata al clinico.

Anche il riscontro di organismi sospetti in un campione d'espettorato deve imporre la segnalazione al clinico: per confermare il sospetto si può colorare il campione con la colorazione modificata di Kinyoun che permette d'identificare la *Nocardia* rispetto a batteri del genere *Actinomyces*.

Isolamento

Crescono bene sui comuni terreni di coltura anche se richiedono per la crescita tempi decisamente più lunghi di altri batteri. Pertanto è necessario sapere se è richiesta la loro ricerca nel campione biologico che deve essere seminato in piastre accuratamente chiuse o tenute in un ambiente umido per almeno due settimane. Durante questa lunga fase d'incubazione si può osservare una sovracrescita della flora accessoria.

ria, sia batterica che fungina, che può nascondere o addirittura impedire la crescita ed il riconoscimento della *Nocardia*.

Bisogna ricordare che le nocardie riescono a sopravvivere al trattamento decontaminante eseguito per la ricerca dei micobatteri e quindi possono contaminarne i terreni di coltura.

Su agar sangue o agar cioccolato le colonie possono rendersi visibili entro 2 giorni d'incubazione a 37 °C, ed hanno un tipico odore di gesso o di muffa.

Successivamente le colonie si ingrandiscono, assumono un aspetto ceroso, raggrinzito ed aderiscono tenacemente al terreno. Si comportano diversamente verso il sangue incorporato nell'agar potendo esprimere una alfa, beta o nessuna emolisi a seconda del ceppo e del tipo di sangue impiegato.

I ceppi sospetti possono essere identificati a livello di specie, ma in genere si preferisce inviarli per conferma in centri di riferimento (universitari o ospedalieri) che eseguono questa diagnostica [►FOTO].

Rhodococcus

Sono batteri Gram positivi, con morfologia variabile da singoli bacilli a filamenti, aerobi, catalasi positivi, immobili. Sono diffusi nell'ambiente ed in alcuni animali ed artropodi.

La specie più riscontrata in campioni biologici umani è il *Rhodococcus equi* con numerosi isolamenti ottenuti da pazienti con AIDS: è un patogeno facoltativo intracellulare che ha la capacità di resistere alla lisi cellulare e causa prevalentemente polmonite, ma si è isolato anche da emocolture o da pazienti con peritonite.

Isolamento

Crescono bene sui comuni terreni di coltura ma con lentezza per cui ci può essere una sovracrescita di germi colonizzanti le sedi del prelievo del campione quindi con difficoltà a riconoscere il batterio. È opportuno impiegare anche terreni selettivi quali agar Columbia con CNA o agar Sabouraud. Comunque le piastre debbono essere incubate per almeno una settimana ed osservate per la crescita ogni 48 ore: si formano colonie piccole, non emolitiche, rotonde, talora mucoidi, di colore bianco giallastro [►FOTO] che tende al rosa e poi al rosso in circa una settimana. Non crescono su agar MacConkey.

I sistemi commerciali non sono molto affidabili nella identificazione corretta a livello di specie per cui, in caso di isolamento sospetto, è opportuno inviare il ceppo in centri di riferimento per una conferma.

Erisipelotrix

Sono organismi Gram positivi simili ai lattobacilli presentandosi in forma di corti bastoncelli o lunghi filamenti: sono catalasi negativi, anaerobi facoltativi, immobili.

Sono ampiamente diffusi in natura ed in molti animali.

La specie più comune è *E. rhusiopathiae* che causa, in soggetti a diretto contatto con gli animali o con i loro prodotti (veterinari, addetti al mattatoio, ecc.), infezioni varie, come cellulite, endocardite, setticemia, artrite.

Isolamento

Il germe cresce bene su agar sangue columbia o agar cioccolato, meglio se in atmosfera arricchita con CO₂, ma cresce bene anche nei terreni liquidi per emocoltura.

È consigliabile prolungare l'incubazione fino a 72 ore perché dopo 24 ore le colonie sono piccole. Su agar sangue le colonie sono grigiastre, traslucide, e producono emolisi alfa.

Per l'identificazione vanno bene i test commerciali manuali ed automatici.

Antibiogramma

Non è standardizzato. La maggior parte dei ceppi sono sensibili ai β-lattamici, ai chinolonici, e clindamicina, mentre sono resistenti alla vancomicina che può essere impiegata per la conferma identificativa del ceppo.

Gardnerella vaginalis

Sono batteri immobili, che alla colorazione di Gram si possono presentare come bastoncini Gram negativi o Gram variabili, di forma non regolare, anaerobi facoltativi, catalasi ed ossidasi negativi. Crescono con difficoltà anche su terreni al sangue mentre su quello al sangue umano o di coniglio formano piccolissime colonie β-emolitiche dopo 48 ore d'incubazione a 37°C: l'emolisi non è prodotta su agar sangue di pecora.

Questo organismo fa parte della flora batterica commensale della mucosa vaginale in oltre il 70% della popolazione femminile in età fertile ma in alcune circostanze, quando si sviluppa una vaginosi batterica, costituisce la flora prevalente insieme ad altri batteri anaerobi, in particolare del genere *Mobiluncus*.

La *Gardnerella vaginalis* può essere trasmessa al partner maschile per contatto sessuale e, seppure raramente, può causare infezioni urinarie.

Identificazione

Non è necessario eseguire l'esame colturale per la conferma di vaginosi batterica in quanto per la diagnosi è sufficiente uno striscio di materiale vaginale colorato con il Gram.

Si osservano infatti numerose cellule epiteliali completamente infarcite del batterio in presenza o meno di altra flora anaerobia, ma, generalmente, con scarsa o nulla presenza di polimorfonucleati [► FOTO].

La coltura può essere fatta su agar sangue umano incubato per 48 ore in atmosfera anaerobia e ne sono riportati due aspetti su agar *Gardnerella* con sangue umano [► FOTO].

Antibiogramma

Non si esegue. Il batterio è di norma sensibile a metronidazolo ed ampicillina che sono gli antibiotici di scelta per la terapia.

Lactobacillus

Sono batteri pleiomorfi, presentandosi come bastoncini più o meno lunghi e di diametro variabile (da esili filamenti a grossi coccobacilli), Gram positivi, ma con tendenza a decolorarsi se si insiste troppo con il decolorante.

Sono presenti in varie sedi del nostro organismo quali bocca, intestino e vagina dove esercitano un importante ruolo di difesa nei confronti di altri microrganismi patogeni, grazie anche alla produzione di acido lattico che, abbassando il pH vaginale a livelli di forte acidità, impedisce la loro adesione e proliferazione.

Sono immobili, catalasi e nitrati negativi, microaerofili, ma alcune specie sono anaerobie strette. Possono causare infezioni vere solo in rare occasioni ed in genere in soggetti con ridotte difese immunitarie.

Isolamento

Di norma la loro ricerca è eseguita solo su essudato vaginale per confermarne la presenza in donne sessualmente attive, accompagnando sempre l'esame colturale con uno striscio batterioscopico per non perdere le specie anaerobie strette e per osservare le associazioni eventuali con altri batteri.

Il tampone vaginale è seminato su una piastra di agar sangue Columbia o agar Rogosa ed incubato per 48 ore a 37 °C in anaerobiosi.

Su agar sangue le colonie sono piccole alfa emolitiche [►FOTO], mentre su agar Rogosa [►FOTO] si osservano colonie con morfologia diversa a seconda della specie isolata.

Il loro ritrovamento in campioni di norma sterili impone un contatto diretto con il clinico per valutare il loro eventuale ruolo nella patologia infettiva del paziente.

Schema per inquadrare a livello di genere i batteri Gram positivi rari o “difficili”

Genere	Produzione di spore	Catalasi	Mobilità	Colorazione di Gram
<i>BACILLUS</i>	sì	+	+/-	Variabile
<i>CORYNEBACTERIUM</i>	NO	+	-	Positivo
<i>LACTOBACILLUS</i>	NO	-	-/+	Variabile
<i>ERYSIPELIOTRIX</i>	NO	-	-	Positivo
<i>PROPIONIBACTERIUM</i>	NO	+	-	Positivo

Capitolo VII

Bacilli Gram negativi

Enterobacteriaceae

Questa famiglia comprende alcuni batteri patogeni che possono causare malattie infettive nell'uomo a carico dell'apparato intestinale e numerosi batteri, di norma normali abitanti del tratto intestinale, ma che occasionalmente possono provocare infezioni in diversi organi o apparati, con manifestazioni cliniche variabili da lievi a molto gravi.

I batteri appartenenti a questa grande famiglia sono Gram negativi, a forma di bastoncino o coccobacillo, non sporigeni e variabili per la motilità.

Sono ampiamente diffusi nell'ambiente, soprattutto nell'intestino dell'uomo e degli animali che, spesso, costituiscono il loro "reservoir". Meno frequentemente si riscontrano in campioni clinici prelevati da sedi diverse dall'intestino o dalle urine e sono responsabili di gran parte delle infezioni contratte in ambiente ospedaliero.

Con l'eccezione della *Shigella*, le altre specie possono causare anche gravi infezioni extraintestinali quali ascessi, meningiti, setticemie, infezioni delle ferite, polmoniti, infezioni urinarie.

Escherichia coli

È in assoluto il batterio enterico più spesso isolato da campioni clinici e nelle urinocolture costituisce circa l'80% degli isolamenti da pazienti ambulatoriali ed il 50% da pazienti ospedalizzati, ma è anche quello maggiormente presente in tutti gli altri materiali biologici.

L'*Escherichia coli* è un ospite normale dell'intestino nell'uomo e negli animali dove contribuisce a mantenere l'ecosistema batterico.

Tuttavia esistono ceppi che hanno acquisito particolari plasmidi di virulenza, quali la capacità d'aderire e colonizzare l'epitelio intestinale o di produrre vari tipi di tossine enteritogene, che provocano nell'uomo gastroenteriti direttamente collegate al tipo d'*Escherichia coli* coinvolto nell'episodio e che hanno permesso di suddividere i vari stiptipi in: **enterotossici** (ETEC), **enteropatogeni** (EPEC), **enteroinvasivi** (EIEC), **enteroemorragici** (EHEC) e, descritti recentemente, **enteroaggreganti** (EaggEC).

I ceppi **enterotossici** sono spesso causa di gastroenteriti acute infantili (bambini con età di solito inferiore a 2 anni), epidemiche o di casi sporadici, con dolori addominali, febbre modesta ed improvvisa e profusa diarrea acquosa similcolerica. Colpiscono anche gli adulti in cui sono prevalentemente responsabili della così detta "diarrea del viaggiatore". Producono due tossine mediate da plasmidi, ST stabile al calore ed LT labile al calore, che possono essere evidenziate con l'impiego di colture cellulari o con test commerciali.

I ceppi **enteropatogeni** causano gastroenteriti simili alle precedenti nei bambini piccoli con diarrea acquosa, vomito, febbre e muco nelle feci, di solito senza sangue associato. Nei casi epidemici, esclusi dall'eziologia gli altri patogeni più importanti, è opportuno ricorrere alla sierotipizzazione completa degli antigeni O ed H, che non è semplice visto il gran numero di sierogruppi coinvolti e che pertanto dovrebbe essere affidata ad un Centro di Riferimento Regionale.

È ormai dimostrato che non esiste sempre una correlazione diretta tra sierotipo enteropatogeno e patogenicità, nel senso che sierotipi etichettati come patogeni non producono tossina e viceversa sierotipi non ritenuti tali la producono; assume quindi grande importanza la dimostrazione della presenza della tossina nel materiale fecale.

I ceppi **enteroinvasivi** causano un'enterite "*Shigella like*" caratterizzata da febbre, dolori addominali, diarrea acquosa, con forme anche gravi con presenza di sangue, muco e numerosi leucociti. Sono ceppi immobili talora lattosio negativi, isolati raramente. Si identificano con antisieri specifici anti O ed H o con prove in vitro su colture cellulari Hep-2 o HeLa.

I ceppi **enteroemorragici** sono causa di tossinfezioni alimentari per ingestione di acqua o cibi contaminati costituiti prevalentemente da carne bovina in particolare poco cotta (hamburger).

È stata dimostrata la trasmissione da persona a persona per via fecale orale. Vengono prodotte due distinte tossine (verotossine 1 e 2), chiamate anche tossine "*Shigella-like*".

Il ceppo più frequentemente isolato è l'*Escherichia coli* O157:H7 che, a differenza degli altri ceppi di *E. coli*, non fermenta il sorbitolo e quindi può essere identificato in terreni di coltura che incorporano questo zucchero, andando quindi ad identificare quelle colonie che appaiono incolori su questo terreno dopo 24-48 ore d'incubazione in termostato. Il riconoscimento è possibile e rapido impiegando kit commerciali che riconoscono l'antigene O157.

Le manifestazioni cliniche di questa infezione variano da casi asintomatici, leggeri o gravi con diarrea profusa all'inizio senza sangue ma poi con sangue, dolori addominali e leucociti nelle feci, più gravi nei bambini che negli adulti. In una piccola percentuale di soggetti (< al 10% dei casi) si hanno gravi complicazioni che possono portare alla sindrome uremico-emolitica (HUS), caratterizzata da anemia emolitica, trombocitopenia e scompenso renale, quindi con quadri clinici che possono portare a morte il paziente o determinare gravi danni a livello renale, cardiaco o nervoso.

I ceppi **enteroaggreganti** non producono tossine, non sono invasivi e causano una diarrea cronica più grave nei bambini, che può essere diagnosticata solo in centri specializzati

Isolamento

L'isolamento non pone alcun problema in quanto i batteri crescono bene su tutti i più comuni terreni di coltura: gli isolamenti dalle feci debbono prevedere anche l'impiego di terreni non eccessivamente selettivi poiché alcuni potrebbero inibirne la crescita. Va bene l'agar MacConkey su cui le colonie appaiono rosa con opacizzazione del

terreno intorno alla crescita e, da campioni urinari, molto validi sono i terreni cromogenici che permettono d'evidenziare subito il ceppo rispetto alla restante flora eventualmente concomitante [►► FOTO].

Identificazione

I ceppi identificati biochimicamente come *E. coli* debbono essere confermati con l'impiego di antisieri specifici anti O, H e K, ma è preferibile inviarli ad un Centro di Riferimento della propria Regione o nazionale (ISS a Roma).

Antibiogramma

Possono essere impiegati senza problemi tutti i vari sistemi automatici o il classico Kirby-Bauer manuale. È opportuno prestare attenzione ai ceppi produttori di ESβL (β-lattamasi a largo spettro) riconoscibili se si esegue l'antibiogramma su agar di Mueller-Hinton avendo l'accortezza di porre i dischetti delle cefalosporine sotto indicate ad una distanza di 3 cm, centro-centro, dal disco contenente acido clavulanico come inibitore delle β-lattamasi: questi ceppi presentano potenziamento dell'alone d'inibizione dell'aztreonam, ceftazidime, ceftriaxone e cefotaxime in presenza dell'inibitore delle β-lattamasi come l'acido clavulanico, che si evidenzia con un alone anomalo dell'inibizione della crescita batterica, a forma di “tappo di spumante”.

Salmonella

Il genere *Salmonella* comprende più di 2400 specie diverse, ma quelle patogene per l'uomo sono, in primis, *Salmonella typhi*, in forte calo nel nostro paese, *Salmonella paratyphi A, B, C*, e tutte le altre specie raggruppabili in vari gruppi, ma di cui le più importanti sono *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*, che rappresentano la grande maggioranza degli stipiti isolati dall'uomo.

Le salmonelle sono parassiti intestinali dell'uomo ma anche di molti animali, compresi uccelli, rettili, roditori ed animali domestici. Si ritrovano frequentemente in prelievi ambientali, fiumi, acque dove possono sopravvivere a lungo (per settimane nelle acque e per anni nel suolo). Sono state isolate da molti cibi, compresi vegetali e frutta, che costituiscono i veicoli più importanti per infettare l'uomo. Possono anche essere trasmesse da soggetti malati o portatori attraverso la via fecale-orale.

Alcuni sierotipi si sono adattati specificatamente all'uomo (*S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. sendai*) o animali: (*S. suis* nei suini e *S. pullorum* nei volatili) mentre la maggior parte possono infettare un ampio range di ospiti, compreso l'uomo.

Sono germi mobili (tranne la *S. pullorum*), crescono a temperature variabili da 7 a 48 °C, sia in aero sia in anaerobiosi.

Isolamento

Per l'isolamento da materiale fecale si possono usare, insieme a terreni non selettivi, anche terreni di coltura selettivi per ridurre la carica della flora commensale (agar

SS, agar Hektoen, agar XLD) facendo precedere la semina da un'arricchimento in brodo (selenito, tetratioato, ecc.), dove le feci non dovrebbero stare per più di 12 ore per impedire una sovra crescita della flora commensale. Si possono usare anche terreni più fortemente selettivi (agar verde brillante o al solfato di bismuto, buono soprattutto per *S. typhi*), ma da impiegare da soli unicamente in corso di episodi epidemici.

Oggi si possono usare anche i terreni cromogenici che sono ugualmente selettivi ma che, forse, differenziano meglio le colonie sospette [► FOTO].

Non è opportuno fare la ricerca sui tamponi rettali perché la resa è molto inferiore a quella eseguita direttamente sulle feci.

Morfologia delle colonie

Varia in relazione al terreno impiegato ma è bene ancora oggi ricordarsi che, tranne rarissime eccezioni, le salmonelle sono lattosio negative.

Identificazione

Le colonie sospette devono essere confermate con test biochimici (tutti quelli del commercio vanno bene) e sierologici con gli antigeni di gruppo e di specie. Siccome l'identificazione sierologica non è sempre agevole ed impone comunque, almeno per il riconoscimento della specie, tutta una batteria di antisieri anti O (antigene somatico) ed anti H (antigene ciliare), non è disonorevole fermarsi alla conferma del gruppo di appartenenza, in quanto alla portata di tutti i laboratori, e lasciare ai centri di riferimento l'onere dell'identificazione a livello di specie.

Antibiogramma

Non pone problemi e tutti i sistemi danno risultati accettabili. L'NCCLS raccomanda di non refertare, anche se attivi in vitro, gli aminoglicosidi e le cefalosporine di seconda e terza generazione perché non si sono dimostrati efficaci clinicamente.

Shigella

I batteri appartenenti a questo genere causano la dissenteria bacillare, malattia caratterizzata da dolori addominali, febbre, grandi quantità di feci diarroiche e, dopo 1-2 giorni, piccoli volumi di feci che spesso contengono molto sangue, muco e leucociti. I batteri del genere *Shigella* raramente oltrepassano la mucosa intestinale e difficilmente si ritrovano nel sangue. Sono quattro le specie che interessano la patologia dell'uomo: *S. dysenteriae* (Sierogruppo A, che causa la forma più grave di dissenteria), *S. flexneri* (Sierogruppo B), *S. boydii* (Sierogruppo C), *S. sonnei* (Sierogruppo D), quest'ultima la più diffusa nel nostro paese.

Sono batteri immobili e, tranne rare eccezioni, non producono gas dalla fermentazione dei carboidrati.

Isolamento

L'isolamento è eseguito direttamente dalle feci abbinando terreni selettivi (SS, Hektoen enteric) e non troppo selettivi (XLD, MacConkey) ricordando che i migliori risultati si ottengono seminando i campioni subito dopo l'emissione e comunque non oltre le due ore dalla raccolta.

Si possono usare anche i brodi d'arricchimento al selenito ricordando che è necessario eseguire subcolture in terreno solido non dopo 12 ore d'incubazione per prevenire l'effetto inibente di questa sostanza sulla loro crescita.

Prima della semina bisogna osservare il campione di feci e seminare le parti che presentano striature di sangue, pus o muco in quanto permettono la maggior resa nella coltura.

A differenza delle salmonelle, le shigelle devono essere coltivate su terreni non eccessivamente selettivi altrimenti si possono perdere alcuni ceppi più sensibili alle sostanze inibenti presenti nel terreno: sarebbe quindi buona norma abbinare un terreno scarsamente o per nulla selettivo (ad esempio MacConkey) ad uno mediamente selettivo (Hektoen Enteric agar o XLD).

Morfologia delle colonie

Varia secondo il terreno utilizzato. Su agar cromogenico (SMID® Biomérieux) le colonie di *Shigella flexneri* si presentano come nella foto A e quelle di *Shigella sonnei* come nella foto B [►► FOTO].

Identificazione

Le colonie sospette sono trapiantate su agar sangue o agar triptosio per eseguire la ricerca dell'antigene di gruppo con i singoli antisieri. Si può procedere anche all'identificazione biochimica con i vari kit del commercio. I ceppi isolati debbono essere inviati al centro di riferimento per la conferma della specie.

Antibiogramma

Si esegue con il classico Kirby-Bauer o con altri sistemi del commercio. Anche per la *Shigella* valgono le stesse raccomandazione dell'NCCLS indicate per la *Salmonella*.

Altre *Enterobacteriaceae* d'interesse clinico

Si riportano di seguito altre specie di Enterobatteri di comune riscontro in Microbiologia clinica potendosi isolare da numerosi materiali biologici anche di sedi extra intestinali.

Questi microrganismi, normali abitanti dell'intestino dell'uomo, possono produrre infezioni anche gravi e quindi debbono essere correttamente riconosciuti a livello di specie e devono essere sottoposti ad antibiogramma per il diverso comportamento ai vari antibiotici impiegati in terapia. Della maggior parte di essi saranno descritte solo le caratteristiche più salienti.

Citrobacter

Le specie più importanti in patologia umana sono: *C. amalonaticus*, *C. freundii* e *C. koseri* (chiamato anche *C. diversus*) [► FOTO].

Citrobacter freundii è la specie più frequentemente isolata e sembra essere in grado di dare anche manifestazioni enteriche in quanto capace di produrre una tossina con attività citotossica. Su alcuni terreni di coltura (ad esempio SS agar, ma anche sui terreni cromogenici con SMID) le colonie sono simili a quelle di salmonella ed i ceppi testati eventualmente con gli antigeni polivalenti anti salmonella possono dare un'agglutinazione e quindi essere non correttamente identificati se ci si limita a questa indagine. È opportuno allora eseguire sempre una galleria di test biochimici per confermare correttamente la specie.

Questi batteri, insieme alle specie di *Enterobacter* e *Serratia* tendono a diventare resistenti ad alcuni farmaci già durante la terapia per cui è necessario ripetere il test dopo alcuni giorni dal primo antibiogramma.

Enterobacter

Le specie più frequentemente isolate in patologia umana sono *E. aerogenes* e *E. cloacae*, seguite a debita distanza da *E. sakazakii* e *E. agglomerans*. A questi deve essere aggiunta la specie *Hafnia alvei*, in passato denominata *E. alvei*.

Sono batteri che in genere mostrano un discreto grado di resistenza agli antibiotici più comuni e sono talora produttori di ESβL.

Klebsiella

Le specie più frequentemente causa d'infezioni nell'uomo sono *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* che si differenziano biochimicamente tra loro perché la prima è indolo negativa e la seconda indolo positiva.

Si presentano come coccobacilli Gram negativi, immobili, responsabili frequentemente di infezioni urinarie, dell'apparato respiratorio, setticemie, meningiti ed infezioni di ferite, più spesso riscontrabili in ambiente ospedaliero.

Isolamento

L'isolamento è facile e rapido su tutti i terreni di coltura.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono larghe, tipicamente mucose per produzione di una capsula [► FOTO].

I ceppi mucosi si evidenziano bene quando si toccano con l'ansa perché sollevandola rimane attaccata all'ansa parte della colonia formando un vero filamento.

Identificazione

È eseguita con sistemi pronti del commercio che danno buoni risultati.

Antibiogramma

Si esegue con le normali tecniche in uso.

Valgono anche ed ancora di più per il genere *Klebsiella* le stesse considerazioni fatte al riguardo delle β -lattamasi già espresse per l'*E. coli* [► FOTO].

Proteus

A questo genere appartengono solo le specie *P. mirabilis* e *P. vulgaris* in quanto l'ex *P.morganii* viene ora classificato come *Morganella morganii* e l'ex *P. rettgeri* è classificato come *Providencia rettgeri*. Sono bastoncini Gram negativi, mobili.

Sono causa prevalentemente di infezioni urinarie ma anche di infezioni in altri organi o apparati, comprese setticemie, specie in ambiente ospedaliero. Recentemente è stata segnalata un'altra specie *P. penneri*, isolata occasionalmente da campioni clinici e descritta come patogeno nosocomiale.

Isolamento

L'isolamento è facile sui vari terreni di coltura sia selettivi sia non selettivi, come l'agar sangue, dove presentano la caratteristica della sciamatura ad ondate (come un sasso nello stagno) [► FOTO]. Le colonie hanno un caratteristico odore pungente e tendono a confluire su terreni non selettivi.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono lattosio negative, non hanno particolari caratteristiche e variano a seconda del terreno impiegato.

Identificazione

P. mirabilis si distingue da *P. vulgaris* perché quest'ultimo è ornitina decarbossilasi negativo ed indolo positivo. Vanno bene tutti i vari sistemi del commercio.

Antibiogramma

Non esistono particolari problemi per il saggio.

Prestare particolare attenzione ai ceppi, in aumento in particolare in Italia, che producono ES β L.

Providencia

Sono bacilli Gram negativi, generalmente mobili, anaerobi facoltativi diffusi nell'ambiente esterno.

Le specie di maggiore interesse umano sono *P. stuartii* e *P. rettgeri* (in passato noto come *Proteus rettgeri*). Come la *Serratia* sono germi che si isolano prevalentemente da pazienti ricoverati in ospedale (pazienti immunodepressi o ricoverati in reparti a forte rischio infettivo) nei quali provocano infezioni urinarie o delle ferite chirurgiche, ma anche setticemie.

Isolamento

Si può usare l'agar MacConkey dove le colonie, lattosio negative, crescono molto bene in 18-24 ore.

Identificazione

Si impiegano i vari kit del commercio con buoni risultati.

Antibiogramma

Sono batteri spesso multiresistenti e quindi è necessario eseguire l'antibiogramma su agar Mueller-Hinton senza sangue con la tecnica di Kirby-Bauer o con i vari sistemi del commercio.

È opportuno anche verificare la presenza di ceppi con β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) come già indicato in precedenza per *E. coli*

Serratia

Sono bacilli Gram negativi, mobili, anaerobi facoltativi diffusi nell'ambiente esterno.

La specie di interesse umano è *Serratia marcescens* che può causare gravi infezioni polmonari, setticemie ed infezioni urinarie tutte quasi esclusivamente in ambito nosocomiale ed in pazienti immunodepressi o ricoverati in reparti a forte rischio infettivo. Questo germe può produrre un tipico pigmento rosso che colora nettamente le colonie e che rende facile il riconoscimento; tuttavia esistono molti ceppi che non lo producono e che devono dunque essere identificati con i comuni sistemi biochimici [►FOTO].

Isolamento

Si può usare l'agar MacConkey dove le colonie, lattosio negative, crescono molto bene in 18-24 ore.

Identificazione

Si impiegano i vari kit del commercio con buoni risultati.

Antibiogramma

Si esegue su agar Mueller-Hinton senza sangue o con i vari sistemi del commercio.

Determinare la presenza di ceppi con β -lattamasi a spettro stesso (ESBL) (metodo del doppio disco o con l'E-test® comparando ceftazidime con ceftazidime + acido clavulanico o con sistemi automatici).

Yersinia

Il genere comprende anche *Yersinia pestis* (agente etiologico della peste nell'uomo e nei ratti, tristemente nota per le pandemie avvenute in epoca medioevale e che fortunatamente oggi è limitata in piccole zone geografiche) e *Yersinia pseudotuberculosis*, decisa-

mente veri patogeni per l'uomo che non sono trattati in questo manuale che si limita invece a descrivere le caratteristiche dell'altra specie patogena: *Yersinia enterocolitica*.

Sono bacilli Gram negativi, immobili a 37 °C ma mobili a 25 °C per flagelli peritrichi, aerobi-anaerobi facoltativi che possono provocare una zoonosi per trasferimento del patogeno all'uomo che risulta un ospite accidentale.

Y. enterocolitica può essere isolata nell'uomo e in numerosi animali (roditori, conigli, maiali), ma anche nell'acqua e nel suolo: poiché in grado di sopravvivere e moltiplicarsi a temperatura di refrigerazione (4 °C), è stata implicata in epidemie associate al consumo del latte ed altri alimenti contaminati conservati in frigorifero. Sono stati identificati più di 50 sierotipi, ma pochi sono i patogeni per l'uomo. Tra questi i sierogruppi O:3 e O:9 colonizzano le tonsille del maiale e quindi le carni suine rappresentano un importante serbatoio d'infezione. Nell'uomo provoca enterocolite caratterizzata da diarrea, talora emorragica, febbre moderata e dolori addominali che possono mimare quelli di un'appendicite (linfadenite mesenterica, chiamata anche sindrome pseudo appendicolare) che colpisce prevalentemente i giovani fino a 20 anni d'età. Sono state anche descritte infezioni a localizzazione extra intestinale.

Nelle feci sono presenti leucociti e spesso emazie. La malattia intestinale è di solito autolimitante ma si possono osservare anche forme clinicamente più severe.

Isolamento

Di norma la ricerca è eseguita solo su richiesta specifica.

Si può usare l'agar MacConkey ma le colonie sono molto più piccole di quelle degli altri enterobatteri, incolori essendo di norma lattosio negative. È preferibile l'impiego di un terreno selettivo a base di cefsulodin-irgasan-novobiocina (CIN agar) incubando a temperatura ambiente per almeno 48 ore.

Le colonie sono trasparenti in periferia, traslucide e presentano un centro rosso scuro [► FOTO].

Identificazione

Si impiegano i vari kit del commercio con buoni risultati.

Antibiogramma

Si esegue su agar Mueller-Hinton senza sangue o con i vari sistemi del commercio.

Vibrionoceae

Aeromonas

Sono bastoncini Gram negativi, ma possono essere anche di forma coccobacillare o filamentosa.

Sono in grado di crescere a temperature comprese tra 0 e 45 °C. Tutte le specie sono mobili ad eccezione di *A. salmonicida* e *A. media*. Il loro habitat naturale è l'acqua dolce e marina.

Sono responsabili di un'ampia varietà di malattie in animali a sangue caldo e freddo. Nell'uomo sono causa d'infezioni intestinali, ma anche in altre sedi (endocarditi, meningiti, setticemie, infezioni oculari), mentre l'isolamento da materiali respiratori, dell'apparato genito urinario e delle ferite non è sicuro indice d'infezione. Anche l'isolamento dalle feci non indica con certezza il ruolo patogeno del batterio.

L'infezione colpisce prevalentemente i bambini piccoli.

Le specie più riscontrate in patologia sono *A. hydrophila* e *A. caviae*, in grado di produrre enterotossine e citotossine e che passano all'uomo attraverso ingestione di acqua contaminata.

Isolamento

È consigliabile impiegare insieme un terreno selettivo per *Aeromonas* (agar sangue con cefsulodin-irgasan-novobiocina) ed uno non selettivo (agar MacConkey) [►FOTO]. Sulle colonie sospette si può eseguire il test dell'ossidasi e dell'indolo che risultano positivi. Su agar sangue *A. hydrophila* e *A. veroni* sono emolitiche.

Identificazione

Possono essere impiegati i kit commerciali che tuttavia presentano difficoltà nell'identificazione del batterio a livello di specie.

Antibiogramma

La maggior parte dei ceppi è resistente all'ampicillina mentre le varie specie si comportano in maniera differente nei confronti delle cefalosporine a spettro stretto o allargato in quanto una buona parte dei ceppi produce β -lattamasi inducibili che possono non essere rilevate dai sistemi automatici che impiegano la tecnica di microdiluzione.

Vibrio

A questo genere appartengono più di 30 specie e di cui 12 sono patogene per l'uomo o comunque isolate da campioni clinici umani. Sono coccobacilli Gram negativi, mobili per la presenza di un singolo flagello polare, dalla caratteristica forma a virgola o a bastoncino. Sono presenti nelle acque salmastre o salate e l'uomo s'infetta ingerendo acqua, molluschi o pesce inquinato da questi batteri, oppure nuotando in acque contaminate si può produrre ferite o sviluppare anche infezioni sistemiche. Le specie più importanti sono: *V. cholerae* 01 (con due biotipi: Classico ed El Tor) e *non* 01 (non agglutinabile dall'antisiero), *V. cholerae* 0139, *V. parahaemolyticus*. Tutte queste specie possono provocare gastroenteriti acute con perdita massiva di liquidi e gravissima disidratazione per produzione di una potente enterotossina, ma si possono osservare anche infezioni più leggere o portatori asintomatici.

Isolamento

L'isolamento dalle feci viene di solito eseguito su terreni particolari (es.: agar TCBS) che sono selettivi per il vibrione. Non impiegare i classici terreni per la ricerca di salmonelle e shigelle. Raccomandabile è un prearricchimento in acqua peptonata alcalina

(pH 8,4) perché inibisce la crescita di molti batteri commensali dell'intestino e favorisce lo sviluppo del vibrione che è molto sensibile all'ambiente acido; questo terreno liquido si presta molto bene anche come mezzo di trasporto delle feci. A questo scopo s'inoculano 1 ml di feci liquide o circa 1 grammo di feci semisolidi in 10 ml d'acqua peptonata, incubando a 37 °C e facendo una subcoltura in TCBS entro un massimo di 18 ore. L'isolamento da altre sedi (sangue, ferite, liquidi interni di norma sterili) è fatto su agar sangue di montone dove solo la specie *V. cholerae* 01 produce emolisi intorno alla colonia. Non è invece indicato l'agar MacConkey perché non tutti gli stipti riescono a crescere su questo terreno.

V. parahaemolyticus cresce molto meglio, essendo alofilo, in terreni addizionati con 1% di NaCl, elemento importante anche per rendere più evidente la positività delle reazioni biochimiche.

Morfologia delle colonie

Su TCBS dopo 24 ore d'incubazione le colonie appaiono lisce e gialle, di 2-4 mm di diametro, con un centro opaco e trasparenti in periferia (stesse colonie anche per *V. alginolyticus*), mentre *V. parahaemolyticus*, che non utilizza il saccarosio, dà colonie blu-verdi. Le colonie che riescono a crescere su MacConkey sono chiare in quanto non utilizzano il lattosio.

Identificazione

Le colonie sospette sono trapiantate su agar sangue e su di esse si esegue il test dell'ossidasi (positivo), l'agglutinazione con l'antisiero specifico anti 01, si osserva l'emolisi su agar sangue di montone (positiva per il sierotipo El Tor e negativa per il Classico), e si sottopone il ceppo ad una galleria di test biochimici (API o altro). I ceppi sospetti debbono essere inviati ad un centro di riferimento per la conferma di specie.

Antibiogramma

È raccomandata la tecnica di Kirby-Bauer su Mueller-Hinton agar per saggiare ceppi di *Vibrio parahaemolyticus*. S'impiegano i seguenti antibiotici: cloramfenicolo, ampicillina, tetraciclina, gentamicina, cotrimossazolo. Per NCCLS è raccomandata la tecnica di diluizione.

Genere *Campylobacter* e *Helicobacter*

Campylobacter

Il genere *Campylobacter* comprende batteri Gram negativi a forma di sottile bastoncino ricurvo, asporigeni, microaerofili, mobili con un caratteristico movimento d'avvitamento su se stessi "a cavatappo", e presentano un flagello polare ad una o entrambe le estremità. Nelle colture vecchie o esposte all'aria si modifica la morfologia del batterio che si trasforma in elemento sferico o coccoide, che difficilmente è in grado di riprodursi. La crescita deve avvenire in un'atmosfera microaerofila contenen-

te all'incirca i seguenti gas: O₂ (5%), CO₂ (10%), N₂ (85%), che si ottiene con l'impiego di vari sistemi commerciali in buste singole o giare.

Alcune specie sono patogene per l'uomo e causano enteriti acute, specie nei bambini; la trasmissione è di tipo fecale-orale e si verifica per contagio diretto interumano o, più frequentemente, attraverso acqua ed alimenti contaminati (in particolare pollame e latticini).

Nell'uomo l'infezione intestinale è d'entità variabile nella durata (2-7 giorni) e nella sintomatologia (casi asintomatici ed enteriti gravi), si manifesta da 1 a 7 giorni dopo il contagio con diarrea acquosa e muco, spesso sangue e leucociti, dolori addominali, febbre, cefalea e malessere generale. Le infezioni sintomatiche sono di solito autolimitanti e talora possono mimare un'appendicite acuta. Si possono osservare, seppure più raramente, anche infezioni extraintestinali (batteriemie, meningiti, endocarditi, infezioni urinarie, ecc.)

Il *C. jejuni* è la specie più frequentemente in causa, ma si possono isolare anche specie diverse come il *C. coli* ed il *C. lari*, mentre il *C. fetus* s'isola soprattutto dal sangue e da siti extraintestinali in soggetti con altre malattie associate.

Isolamento

L'isolamento dalle feci deve essere eseguito utilizzando terreni selettivi con sangue o, meglio, carbone con l'aggiunta di miscele d'antibiotici (in particolare cefoperazone) per inibire la flora batterica normale del tratto intestinale, ricordando di incubare in atmosfera microaerofila. Si possono impiegare membrane sterili con filtri d'acetato di cellulosa con pori da 0,65 µm in quanto i *campylobacter* sono in grado di oltrepassare la membrana a differenza dell'altra flora batterica intestinale (in pratica si pone la membrana sul terreno e si mettono sopra ad essa circa 10 gocce della sospensione fecale, s'incuba per un'ora a 37 °C in atmosfera normale, si elimina il filtro e s'incuba in atmosfera microaerofila).

L'incubazione deve avvenire per almeno 48 ore prima di considerare negativo il campione.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono piatte, leggermente sciamanti, e sul terreno al carbone [►FOTO] possono assumere una morfologia a goccia, con una colorazione che varia secondo il tipo di terreno impiegato. Sui terreni al sangue non si osserva emolisi. Per il mantenimento del ceppo è opportuno eseguire frequentemente delle sub-colture sul terreno al sangue o, meglio se possibile, liofilizzare il ceppo.

Identificazione

Un'identificazione presuntiva si fa usando il test dell'ossidasi (positivo entro pochi secondi), della catalasi (positiva) e dell'idrolisi dell'ippurato (positiva solo per il *C. jejuni*). La colorazione di Gram evidenzia dei bastoncini sottili Gram negativi a forma di "S". La tipica mobilità si osserva stemperando parte della colonia in brodo nutriente ed osservando al microscopio entro pochi minuti.

La conferma si può fare con kit del commercio d'agglutinazione al lattice che però non discriminano tra le varie specie o con il kit dell'API Campy® (Biomérieux) con il quale è possibile evidenziare la specie. Utile risulta anche la prova di sensibilità del ceppo all'acido nalidixico (sensibile) ed alla cefalotina (resistente), eseguibile su piastra d'agar sangue come un normale antibiogramma: a questo proposito bisogna ricordare che a causa del sempre più massiccio impiego in zootecnia di farmaci chinolonici si può osservare resistenza all'acido nalidixico del ceppo isolato che falsa quindi la prova.

Antibiogramma

Non sono stati al momento ancora standardizzati i test di sensibilità. Comunque un Kirby-Bauer su agar sangue o, meglio, un E-test®, per saggiare la sensibilità all'eritromicina (farmaco di 1^a scelta) o alla ciprofloxacina, gentamicina ed amoxicillina/acido clavulanico è sufficiente per indicare la terapia solo nei casi di gravi enterocoliti prolungate nel tempo o per infezioni extraintestinali.

Helicobacter

Il genere comprende varie specie diverse ma quello che interessa più frequentemente la patologia dell'uomo è l'*Helicobacter pylori*, che, riuscendo a colonizzare la mucosa gastrica, causa una gastrite cronica di grado da lieve a grave, che peggiora nel tempo e che può provocare anche ulcere duodenali o, sembra, anche adenocarcinoma gastrico, in assenza di una terapia antibiotica capace di eliminare il batterio dalla sede infettata.

Sono batteri particolari che assumono una forma elicoidale, incurvata che si muovono attivamente per mezzo di flagelli.

Necessitano di un'atmosfera microaerofila, sono catalasi ed ossidasi positivi.

Altre specie patogene per l'uomo sono *H. cinaedi* e *H. fennelliae*.

Isolamento

Di norma si esegue da frammenti biotici prelevati dall'endoscopista durante la gastroscopia. Poiché il batterio è scarsamente resistente nell'ambiente esterno è necessario procedere alla coltura del campione in tempi brevi dopo il prelievo seminandolo subito dopo oppure inviandolo rapidamente in laboratorio in una provetta sterile con alcune gocce di soluzione fisiologica.

La coltura si esegue su terreni non selettivi (agar sangue Columbia o agar cioccolato) e selettivi (Dent o altri) possibilmente tritutando bene il frammento prima della semina in modo da liberarlo dallo strato di muco in cui si trova inglobato. Si incubano poi le piastre in microaerofila in ambiente con alto grado d'umidità e si mantengono fino a sette giorni osservando però giornalmente l'eventuale crescita per procedere subito all'identificazione ed all'antibiogramma.

Per una risposta rapida si può eseguire il test dell'ureasi direttamente sul frammento (i ceppi sono ureasi positivi con reazione rapida che si evidenzia in genere entro poche ore) o eseguire uno striscio dello stesso per apposizione su vetrino e successiva colorazione al Gram: in caso di positività si osservano a 1000 ingrandimenti numerosi bastoncelli tipicamente incurvati, Gram negativi, disposti soprattutto lungo le striature di muco [►► FOTO].

Nei terreni non selettivi si può avere sovracrescita di batteri e/o miceti che colonizzano la mucosa gastrica del paziente e che possono impedire la crescita o il riconoscimento dell'*Helicobacter*.

Morfologia delle colonie

Appaiono molto piccole, a punta di spillo e non sono emolitiche sull'agar al sangue.

Identificazione

Si esegue una prova della catalasi, della ossidasi e della motilità ed una colorazione di Gram prelevando una piccola porzione delle colonie sospette.

Bisogna ricordare che le colture vecchie di alcuni giorni presentano elementi coccoidi, che spesso non sono in grado di crescere in nuove piastre di coltura. Quindi anche l'antibiogramma deve essere eseguito non appena si osserva la crescita batterica in piastra.

Antibiogramma

È eseguito soprattutto in caso di fallimento della terapia antibiotica, anche se l'esito della prova *in vitro* non sempre correla con l'effetto *in vivo*. Risultati più affidabili sembrano essere stati ottenuti con l'impiego dell'E-test®.

Pasteurellaceae

Pasteurella

Sono coccobacilli Gram negativi, immobili, anaerobi facoltativi, catalasi, ossidasi ed indolo positivi.

Sono state isolate da lesioni in varie sedi del corpo, ma principalmente da ferite dovute in particolare a morsi di animali che hanno il batterio nel loro cavo orale.

La specie più frequentemente isolata nell'uomo è *P. multocida* che è stata isolata da ferite per morso specie di cani, in corso di polmoniti croniche e di meningiti.

Isolamento

Il campione biologico deve essere seminato su agar sangue o agar cioccolato, dove il batterio cresce bene e rapidamente dando colonie piccole, translucide, non emolitiche, con un odore di muffa. Non si ha alcuna crescita invece su agar MacConkey, prova che può confermare il sospetto diagnostico in presenza di un coccobacillo Gram negativo che spesso mostra una colorazione bipolare.

Identificazione

Il ceppo è di solito sensibile alla penicillina (disco da 2 unità), fatto del tutto insolito per un batterio Gram negativo. Possono essere anche utilmente impiegati i kit commerciali.

Actinobacillus

Sono coccobacilli Gram negativi, ossidasi positivi (tranne *Actinobacillus actinomyces-comitans*) che possono causare infezioni nell'uomo, specie dopo morsi di animali, ma possono anche provocare endocarditi.

Sono batteri “fastidious” nella crescita ed è necessaria un'incubazione in CO₂.

Insieme a *Haemophilus*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* e *Kingella kingae* costituiscono il gruppo noto come “HACEK”, i cui rappresentanti hanno in comune le caratteristiche colturali, tra cui una crescita lenta; questa proprietà impone una particolare attenzione anche nella valutazione delle emocolture eseguite con i sistemi automatici che, di solito, prevedono un massimo di 7 giorni d'incubazione dei flaconi in cui è stato raccolto il sangue del paziente. Pertanto il laboratorio potrebbe erroneamente indicarli come negativi solo per non averli incubati per il tempo necessario alla crescita di questi batteri.

È evidente quindi, ancora una volta, come sia necessaria una stretta collaborazione con il clinico che deve avvertire il laboratorio di prolungare l'incubazione dei flaconi nel caso sospetti un'infezione provocata da tali microrganismi, anche perché sarebbe improponibile o difficilmente attuabile la gestione ordinaria di tutti i flaconi per tempi superiori alle 2 settimane.

Anche i test di sensibilità non possono essere utilizzati a causa della lentezza della crescita di questi batteri.

Haemophilus

Il genere *Haemophilus* comprende batteri Gram negativi a forma di coccobacillo o talora corti filamenti, asporigeni, immobili.

La crescita ottimale avviene in un'atmosfera umida contenente CO₂ al 5-10% che si ottiene facilmente inserendo una candela accesa in una giara, che poi è chiusa ermeticamente.

Possono causare vari tipi d'infezione con varia gravità (congiuntivite, otite media, broncopolmonite, meningite, pericardite, sepsi, ecc.). La specie più frequentemente responsabile d'infezioni nell'uomo è l'*Haemophilus influenzae*.

Haemophilus parainfluenzae è di norma considerato un germe commensale presente sulla mucosa dell'apparato respiratorio. Tuttavia in alcune occasioni questo batterio può essere causa di gravi infezioni come endocarditi, di batteriemie secondarie e di uretriti. *Haemophilus ducrey* è il responsabile di un'infezione a trasmissione sessuale che determina ulcere genitali con concomitante linfoadenopatia inguinale.

Isolamento

L'isolamento richiede l'impiego di terreni arricchiti con idonee quantità di fattori X e V che sono indispensabili per la crescita per cui deve essere utilizzato un terreno al sangue cotto con l'aggiunta dei fattori di crescita (agar cioccolato). Se il campione contiene flora mista residente è necessario aggiungere all'agar cioccolato anche la bacitracina per rendere più selettivo il terreno e migliorare l'isolamento del ceppo.

Morfologia delle colonie

Le colonie sono piccole, traslucide ed emanano un caratteristico odore di topo. I ceppi capsulati formano colonie più grandi e più lucide [▶FOTO].

Identificazione

L'identificazione si fa stemperando il ceppo in soluzione fisiologica sterile o brodo per ottenere una sospensione 0,5 McFarland, spatolandola con tampone sterile sopra una piastra di Mueller-Hinton agar e applicandoci sopra i dischi dei fattori di crescita (X, V e XV). S'incuba in CO₂ per 24 ore e si osserva la crescita intorno ai dischi: l'*H. influenzae* cresce solo intorno al disco che contiene entrambi i fattori di crescita, mentre l'*H. parainfluenzae* cresce anche intorno al disco con il fattore V [▶FOTO].

In alternativa può essere utilizzato il test NH dell'API® (Biomérieux), che permette la differenziazione anche dei biotipi (non necessaria nella routine).

I ceppi capsulati di tipo b, dotati di maggiore potere patogeno, sono facilmente riconosciuti impiegando un antisiero specifico del commercio saggiato con una sospensione batterica in soluzione fisiologica ottenuta stemperandovi alcune colonie prelevate da una piastra di agar cioccolato senza bacitracina. È opportuno eseguire sempre un controllo negativo testando l'antisiero con la sola fisiologica e le colonie batteriche con sola fisiologica.

Antibiogramma

Il terreno consigliato dall'NCCLS è l'HTM (Hemophilus Test Medium) preparato da pochi giorni, prestando attenzione ad ottenere una soluzione 0,5 McFarland, perché un inoculo troppo povero o troppo ricco può falsare il risultato finale.

Gli antibiotici da saggiare sono: penicillina, ampicillina (o amoxicillina), cloramfenicolo, tetraciclina, cotrimossazolo, rifampicina, amoxicillina/acido clavulanico (o ampicillina/ sulbactam), eritromicina, imipenem, cefotaxime e ceftriaxone.

Si legge la risposta dopo 24 ore d'incubazione a 37 °C in CO₂.

È importante controllare se il ceppo è β-lattamasi positivo, utilizzando test a base di nitrocefina, perché questi stipiti non rispondono alla terapia con penicillina o ampicillina.

I ceppi β-lattamasi positivi determinano la comparsa di una colorazione rosa-rossa sul disco mentre quelli negativi non modificano la colorazione del disco o la fanno virare al giallo.

N.B. I rari ceppi di *H. influenzae* β-lattamasi negativi e resistenti all'ampicillina (BLNAR) debbono, secondo l'NCCLS, essere considerati resistenti (anche se sensibili in vitro!) a: amoxicillina/ac. clavulanico, ampicillina/sulbactam, cefaclor, cefamandolo e cefuroxime.

Pseudomonadaceae

Pseudomonas aeruginosa

Il genere *Pseudomonas* comprende molte specie che colonizzano gli ambienti umidi e che, in alcune occasioni, possono essere causa d'infezioni nell'uomo.

Pseudomonas aeruginosa è il batterio che s'isola più frequentemente in ospedale perché si adatta facilmente in quest'ambiente, possiede molti fattori di virulenza ed è naturalmente resistente a vari antibiotici e ad alcuni disinfettanti. Tuttavia è isolato anche da pazienti comunitari nei quali causa infezioni superficiali (follicoliti specie in soggetti che frequentano spesso le piscine, otiti, infezioni oculari in portatori di lenti a contatto), ma anche malattie più gravi (polmoniti, infezioni urinarie).

Sono bastoncelli Gram negativi, quasi tutti mobili, ossidasi e catalasi positivi.

Isolamento

L'isolamento è facile da materiali di norma sterili sui vari terreni di coltura, mentre per campioni biologici provenienti da sedi con una flora batterica residente può essere necessario ricorrere all'impiego di terreni selettivi, di cui il migliore è quello a base di cetrimide. Sui terreni al sangue i ceppi presentano spesso un alone d'emolisi marcata. La maggior parte degli stipi produce, sia in terreni solidi sia in terreni liquidi che non contengono coloranti aggiunti, un pigmento verde caratteristico mentre rari ceppi possono formare pigmento rosso o marrone scuro; alcuni, in particolare quelli mucoidi isolati dall'apparato respiratorio, non producono alcun tipo di pigmento.

Morfologia delle colonie

Le colonie tendono a sciamare, sono piatte, spesso con riflessi metallici ed emanano un caratteristico odore profumato. Esistono ceppi che producono colonie lisce, più piccole tipo coliformi, oppure gelatinose o mucoidi (ceppi respiratori) [►FOTO].

Identificazione

L'identificazione è facile ed immediata nei ceppi che producono pigmento e si completa con il test dell'ossidasi che risulta positivo in pochi secondi: in questi casi non si procede oltre. Per gli stipiti apigmentati si esegue sempre per primo il test dell'ossidasi e, se positivo, si procede con uno dei tanti sistemi commerciali d'identificazione biochimica. Bisogna ricordare a questo proposito che questi kit non riescono sempre e comunque ad identificare a livello di specie i batteri del genere *Pseudomonas* e quindi è necessario ricorrere ad alcuni test aggiuntivi non sempre disponibili nei laboratori ospedalieri: si tratta comunque di casi rari e spesso di scarso interesse clinico (probabili contaminanti), a meno che il batterio non sia stato isolato da siti normalmente sterili, nel qual caso è doverosa un'identificazione a livello di specie.

Antibiogramma

L'antibiogramma può essere eseguito sia con il classico Kirby-Bauer sia con i vari sistemi automatici e non del commercio. I ceppi isolati in ambiente ospedaliero sono di solito molto più resistenti di quelli ottenuti da pazienti ambulatoriali. Poiché i ceppi sono naturalmente resistenti a tutti gli antibiotici β -lattamici (tranne quelli specifici anti-*pseudomonas*, quali piperacillina, mezlocillina, ceftazidime, imipenem), alle tetracicline, ai macrolidi, al cotrimossazolo, al cloramfenicolo, è inutile saggiarli con queste molecole. In casi particolari può essere utile aggiungere la colistina o la polimixina B a cui in genere lo *pseudomonas* è sensibile.

Burkholderia cepacia

In passato veniva chiamata *Pseudomonas cepacia*.

Sono bastoncini Gram negativi, mobili, ossidasi positivi o deboli, nitrati negativi, ampiamente diffusi in natura ed in ambiente ospedaliero, dove causano infezioni in cui sono direttamente coinvolti alcuni disinfettanti non ben conservati e nei quali i batteri si riproducono attivamente, materiali medici ed apparecchiature contaminate usate per esami invasivi.

Sono germi che provocano infezioni urinarie, respiratorie, infezioni da catetere urinario, artriti settiche, peritoniti, ma anche setticemie.

Questo è un batterio emergente in soggetti con fibrosi cistica e con granulomatosi cronica (entrambe malattie congenite), dove causano infezioni difficilmente controllabili con gli antibiotici e che portano spesso rapidamente a morte il paziente.

Isolamento

Si può usare l'agar MacConkey dove le colonie sono piccole, attaccate al terreno, rosa scuro dopo alcuni giorni (4-7) d'incubazione e producono un forte odore di "terra".

Identificazione

Si impiegano i vari kit del commercio con buoni risultati.

Antibiogramma

È opportuno eseguire sempre l'antibiogramma perché gli isolati possono essere resistenti a molti antibiotici.

Si esegue su agar Mueller-Hinton senza sangue o con i vari sistemi del commercio.

A differenza di *Pseudomonas aeruginosa* è di solito sensibile a cloramfenicolo, cefoperazone e trimetoprim/sulfametossazolo. I ceppi isolati da pazienti con fibrosi cistica sono spesso resistenti a tutti gli antibiotici utilizzabili in terapia.

Pseudomonas putida

P. putida è stata associata ad infezioni di ferite, artrite settica, batteriuria e setticemia. È isolata spesso, insieme con *P. fluorescens* in prelievi ambientali, in particolare pavimenti e lavandini. Queste due specie sono di solito dei contaminanti ambientali e raramente si comportano da patogeni opportunisti per l'uomo.

Isolamento

L'isolamento è facile sui vari terreni di coltura da materiali di norma sterili mentre per campioni biologici provenienti da sedi con una flora batterica residente può essere necessario ricorrere all'impiego di terreni selettivi, di cui il migliore è quello a base di cetrimide, ma va bene anche un MacConkey.

Morfologia delle colonie

Le colonie non hanno particolari caratteristiche.

Identificazione

P. putida si distingue da *P. fluorescens* (e da *P. aeruginosa*) perché è incapace di liquefare la gelatina e di crescere a 42 °C, per la mancata produzione di piocianina e perché possiede più flagelli polari (fino a cinque).

Antibiogramma

Di solito è resistente alla gentamicina ed alla carbenicillina, ma sensibile alle sulfonamidi. La sensibilità è variabile nei confronti delle cefalosporine di terza generazione, mentre è notevole verso i carbapenemici ed i nuovi fluorochinoloni.

Stenotrophomonas maltophilia

Sono batteri Gram negativi, mobili già conosciuti in passato come *Pseudomonas* o *Xanthomonas maltophilia*.

Sono germi ubiquitari, ma si isolano con maggiore frequenza in ambiente ospedaliero dove possono comportarsi come colonizzatori o veri agenti infettivi. Si isolano prevalentemente da pazienti ricoverati in reparti di rianimazione dove si impiegano terapie antibiotiche a largo spettro e per lunghi periodi di tempo. L'insorgenza delle infezioni è facilitata dall'impiego di apparecchi per la ventilazione forzata, cateteri intravascolari o vescicali: si osservano setticemie, polmoniti, infezioni delle ferite chirurgiche. Sono resistenti in vitro a quasi tutti gli antibiotici impiegati in terapia (in particolare ai carbapenemici, mentre sono di solito sensibili al trimetoprim/sulfametossazolo): questa tipologia di risposta all'antibiogramma costituisce un marker per il suo riconoscimento.

Isolamento

Si può usare l'agar MacConkey su cui si formano grandi colonie dopo 18-24 ore d'incubazione oppure, per le urinocolture, il terreno cromogeno CPSID®.

Identificazione

A differenza di *Pseudomonas aeruginosa* questi batteri sono ossidasi ed arginina deidrolasi negativi ma lisina decarbossilasi ed esulina positivi. Per l'identificazione completa bisogna ricorrere ai sistemi del commercio manuali o automatici.

Antibiogramma

L'NCCLS raccomanda l'impiego del metodo di diluizione in brodo (per cotrimossazolo) o in agar per la ricerca della MIC, perché con il metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer) si possono avere risultati non corretti.

Altri batteri Gram negativi

Acinetobacter

Sono batteri Gram negativi, non mobili, ossidasi negativi, nitrati negativi, non fermentanti gli zuccheri, ampiamente diffusi in natura ed in ambiente ospedaliero,

dove riescono a sopravvivere sia in superfici umide sia secche. Si ritrovano anche sulla pelle sana dell'uomo.

Su terreni non selettivi si osservano prevalentemente sotto forma coccobacillare, talora appaiati, mentre in terreni liquidi e con antibiotici, come agenti selettivi, si presentano in forma di bastoncini.

Le specie più spesso isolate sono *A. baumannii* e *A. lwoffii*: sono germi che provocano infezioni urinarie, respiratorie, infezioni da catetere urinario o delle ferite chirurgiche, ma anche setticemie. Fattori di rischio sono terapie antibiotiche precedenti, operazioni chirurgiche e permanenza in reparti di terapia intensiva: spesso la loro presenza da sedi non di norma sterili indica più una colonizzazione che una vera infezione.

Isolamento

Si può usare l'agar MacConkey dove le colonie sono lisce, incolori o debolmente rosate [►►FOTO].

Su agar sangue le colonie si presentano biancastre ed irregolari.

Identificazione

Si impiegano i vari kit del commercio con buoni risultati.

Antibiogramma

È opportuno eseguire sempre l'antibiogramma perché gli isolati possono essere resistenti a molti antibiotici compresi i carbapenemici che anzi talora selezionano ceppi causa di piccole epidemie in ambienti ospedalieri.

Si esegue su agar Mueller-Hinton senza sangue o con i vari sistemi del commercio.

Alcaligenes

Sono bastoncini Gram negativi, mobili, ossidasi positivi (con reazione debole o ritardata), catalasi positivi e nitrati positivi: sono scarsamente attivi sui carboidrati (non sono ossidati nè fermentati). Si trovano nell'ambiente e possono fare parte della flora residente dell'intestino umano.

Le specie più isolate in infezioni dell'uomo sono *A. faecalis* e *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* che possono causare setticemie, infezioni urinarie, meningiti, specie in ambiente ospedaliero.

Crescono bene sui comuni terreni di coltura. Su agar MacConkey si formano colonie incolori che debbono essere identificate con i comuni sistemi commerciali.

Antibiogramma

Non è standardizzato in quanto i valori ottenuti in vitro non correlano con quelli in vivo.

Flavobacterium

Il genere comprende numerose specie che hanno le seguenti caratteristiche: bastoncini Gram negativi, aerobi, ossidasi positivi, immobili, indolo positivi, nitrati

negativi, in genere produttori di pigmento, con metabolismo saccarolitico o non saccarolitico.

Non crescono su agar MacConkey al primo isolamento.

Si ritrovano nell'ambiente e nelle acque, così come in ambito ospedaliero.

La specie più comune in infezioni dell'uomo è *Flavobacterium meningosepticum*, che cresce in colonie che producono nullo o scarso pigmento, e che è responsabile di meningiti nei neonati mentre negli adulti è stato isolato in corso di setticemie.

Isolamento

Su agar sangue crescono colonie bianco-grigiastre, spesso con pigmentazione verdastra dell'agar.

Legionella

Questo genere comprende numerose specie di bacilli che possono diventare filamentosi in coltura: si colorano debolmente in rosso con la colorazione di Gram in quanto non sono colorati bene dalla safranina alla concentrazione usuale mentre funziona meglio la fucsina basica o la colorazione di Gimenez.

Sono aerobi ma crescono meglio in atmosfera di CO₂, debolmente positivi alla reazione dell'ossidasi, catalasi positivi, mobili, scarsamente attivi biochimicamente ed asaccarolitici.

Sono ampiamente diffusi nell'ambiente ma soprattutto in quelli umidi e nelle acque, comprese quelle potabili.

La specie più importante in patologia umana è *Legionella pneumophila* individuata per la prima volta nell'uomo nel corso di un'epidemia ("legionnaires" disease) comparsa in numerosi soggetti riunitisi per una convention a Filadelfia nel 1976.

La manifestazione clinica più importante è la polmonite, tra cui una quota di polmoniti acquisite in comunità (4-15%), ma sono state segnalate anche infezioni extrapolmonari o subcliniche, dimostrate anche dalla presenza di anticorpi a titoli medio alti nella popolazione, che indicano la discreta diffusione del batterio nell'ambiente.

Il batterio può essere ritrovato anche nel sangue in corso di polmonite e sebbene i metodi colturali automatici ne permettano la crescita nei flaconi per germi aerobi, è necessario eseguire subcolture su terreni specifici per la crescita, altrimenti si perdono.

Isolamento

Il materiale di solito impiegato per la ricerca della legionella è il lavaggio bronco-alveolare o l'espettorato nei quali tuttavia non è sempre riscontrabile il batterio che comunque necessita di terreni contenenti L-cisteina e sali ferrosi: quello più usato è il terreno BCYE α con aggiunta di una miscela di antibiotici per prevenire la sovracrescita della flora commensale eventualmente presente nel campione.

Le piastre debbono essere incubate per almeno 5 giorni in "candle jar" ed in atmosfera umida, ottenuta ponendo sul fondo della giara un pezzo di carta bibula bagnata con acqua distillata sterile. Le colonie sono biancastre tendenti al celeste, a margini

tondeggianti ed a vetro smerigliato, appiccicose quando si tenta di sollevarne una parte dalla superficie dell'agar.

Identificazione

Le colonie con le caratteristiche tipiche sono confermate con antisieri agglutinanti del commercio o con l'immunofluorescenza diretta [►FOTO], ricordando tuttavia che esistono specie che producono un'autofluorescenza.

Bisogna ricordare che da qualche tempo è disponibile un test di laboratorio molto affidabile, per la ricerca diretta degli antigeni solubili della legionella nelle urine, che risulta positivo quasi sempre in corso d'infezione acuta e che può anticipare di molto l'esito dell'esame colturale sui materiali respiratori.

È comunque importante eseguire sempre in parallelo anche l'esame colturale per controllare la tipologia dei ceppi circolanti nella propria area; bisogna considerare il fatto che il test immunocromatografico sopra ricordato riconosce solo gli antigeni solubili di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 e non quelli delle altre specie e che può risultare positivo fin dal terzo giorno di malattia, ma restare tale fino ad un anno dall'infezione.

Antibiogramma

Ricordando che la legionella è un batterio intracellulare l'antibiogramma non si esegue perché i test di sensibilità non correlano con la risposta *in vivo*.

Brucella

Causano un'infezione nota come brucellosi che è una zoonosi trasmessa dagli animali infetti per contatto diretto o tramite sostanze o alimenti infettati (latte, formaggi, carne). Le infezioni umane si sono drasticamente ridotte con l'impiego della vaccinazione di massa del bestiame ma esistono ancora zone dove è possibile contrarre la malattia. Le specie note in patologia umana sono: *B. melitensis* (trasmessa da capre e pecore), *B. abortus* (trasmessa dai bovini) e *B. suis* (trasmessa dai maiali).

Sono coccobacilli Gram negativi, immobili, non capsulati, disposti singolarmente o appaiati. Sono aerobi stretti ma *B. abortus* preferisce un'atmosfera arricchita di CO₂ (5-10%), almeno al primo isolamento.

Sono ossidasi positivi (tranne rare eccezioni), catalasi e nitrati positivi.

Sono parassiti intracellulari.

Isolamento

Il materiale più importante è il sangue che deve essere raccolto il più precocemente possibile nella fase acuta della malattia, o il midollo spinale che dà una maggiore percentuale di positività. I sistemi automatici, di cui si usano solo i flaconi per aerobi e che debbono essere incubati per almeno due settimane, permettono la crescita delle brucelle, tuttavia è necessario subcoltivare il sangue in terreni idonei per la crescita del batterio quali: agar triptosio con 5% di siero bovino, agar al cioccolato, agar Brucella con sangue (le colonie non sono emolitiche), incubati in "candle jar" per almeno 5 giorni.

Identificazione

Le colonie si presentano umide, translucide, tondeggianti, grigio-celesti alla luce riflessa: quelle sospette si sottopongono alla prova dell'ossidasi ed alla colorazione di Gram, allungando a 3 minuti il passaggio con il colorante della safranina. Per conferma si impiegano gli antisieri del commercio che permettono anche la differenziazione a livello di specie.

N.B. Le brucelle sono organismi altamente infettanti (classificati nel terzo livello di sicurezza) e quindi debbono essere maneggiati con la massima attenzione ed attenendosi scrupolosamente alle norme di sicurezza impiegate nei laboratori di batteriologia: vestire guanti e lavorare sotto cappe biologiche di classe II con flusso laminare verticale.

Antibiogramma

Non si esegue.

Bordetella

Il genere comprende due specie coinvolte in infezioni dell'uomo: *B. pertussis* e *B. parapertussis*, la prima causa della pertosse e la seconda causa di una forma respiratoria più lieve e meno frequente.

La pertosse è un'infezione altamente contagiosa con trasmissione da persona a persona tramite aerosol.

I batteri si presentano come coccobacilli Gram negativi, sono aerobi obbligati che necessitano di particolari terreni di coltura quali agar di Bordet-Gengou o agar al carbone con sangue di cavallo, cui debbono essere aggiunti antibiotici (cefalexina) per ottimizzare l'isolamento in presenza di una flora accessoria: tuttavia questi terreni debbono essere impiegati freschi e ciò pone notevoli problemi pratici per eseguire, a richiesta, la loro ricerca da campioni clinici.

Isolamento

In passato si ricorreva all'impiego di una piastra di agar Bordet-Gengou messa davanti alla bocca del paziente che era invitato a tossirci direttamente sopra: poiché si è visto che questa tecnica era scarsamente sensibile si preferisce eseguire un prelievo delle secrezioni respiratorie con un tampone naso-faringeo impiegando un particolare tampone costituito da un filo flessibile per raggiungere la faringe posteriore. La fibra del tampone deve essere in dacron perché il cotone inibisce il batterio.

Le piastre sono incubate in "candle jar" sul cui fondo è stata messa una carta bibula impregnata di acqua distillata sterile per creare un ambiente umido necessario allo sviluppo del germe. L'incubazione si deve protrarre per almeno una settimana anche se la crescita di solito avviene entro 2-4 giorni.

Identificazione

I batteri sono catalasi positivi mentre la reazione dell'ossidasi è positiva *B. pertussis* e negativa *B. parapertussis*.

Le colonie su agar sangue al carbone appaiono piccole, rotonde con riflessi argentati (“a goccia di mercurio”) che tendono a diventare grigio-biancastre con l’invecchiamento. Le colonie sospette si identificano attraverso l’impiego dell’immunofluorescenza diretta o con test di agglutinazione impiegando antisieri specifici del commercio.

Se si desidera eseguire una colorazione di Gram è necessario prolungare il tempo di contatto della safranina a 2-3 minuti per permettere una migliore colorazione delle cellule.

Poiché sia la coltura che i test per la conferma di specie non sono molto sensibili, di solito la diagnosi di pertosse è confermata da test sierologici per la ricerca di anticorpi di classe G ed M (Elisa), magari ripetuti nel tempo per la conferma della conversione sierologica.

Antibiogramma

Non si esegue.

Eikenella

A questo genere appartiene una sola specie chiamata *Eikenella corrodens*.

Sono coccobacilli o bastoncini sottili Gram negativi, immobili, ossidasi positivi, catalasi di norma negativi, anaerobi facoltativi, con tendenza a crescita in presenza di aumentata concentrazione di CO₂, che richiedono emina per la crescita in aerobiosi.

Sono batteri residenti normalmente sulle mucose del cavo orale ma che in determinate circostanze possono causare vere infezioni in vari organi o apparati.

Le colonie crescono bene su agar sangue dove si apprezzano meglio dopo 48 ore d’incubazione in atmosfera arricchita di CO₂.

Francisella

Sono batteri pleiomorfi, Gram negativi, immobili, aerobi stretti.

La specie più importante in patologia umana è *Francisella tularensis* agente etiologico della tularemia, zoonosi trasmessa da animali selvatici o contratta nell’ambiente infettato dal microorganismo, in particolare fonti d’acqua non protette.

Il ceppo è molto infettante quindi debbono essere messe in atto tutte le precauzioni necessarie per la manipolazione dei campioni e la loro semina per evitare non improbabili infezioni per il personale.

La coltura è difficile e necessita di terreni arricchiti quali agar cioccolato con aggiunta di Isovitalex® o agar sangue con glucosio e cistina, meglio se con aggiunta di penicillina per ridurre la presenza di batteri contaminanti.

Le colonie si presentano tonde, lisce, leggermente mucoidi con una leggera zona di alfa emolisi intorno alla crescita e si evidenziano meglio dopo 48 ore d’incubazione.

Per tali motivi la diagnosi si ottiene più facilmente con la ricerca degli anticorpi specifici.

Schema per inquadrare a livello di genere i batteri Gram negativi rari o “difficili”

Genere	Capnofilia	Motilità	Ossidasi	Catalasi	Crescita su agar MacConkey
<i>ACTINOBACILLUS</i>	–(*)	–	+(*)	+	+/(–)
<i>CAPNOCYTOPHAGA</i>	+	–	–/+	+/-	–
<i>CARDIOBACTERIUM</i>	+	–	+	–	–
<i>CHROMOBACTERIUM</i>	–	+	+	+	+
<i>EIKENELLA</i>	+	–	+	–	–
<i>KINGELLA</i>	–	–	+	–	–
<i>PASTEURELLA</i>	–	–	+	+	–
<i>STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS</i>	+	–	–	–	–

(*) *A. actinomycetemcomitans* è capnofilico e spesso ossidasi negativo o debolmente positivo.

Capitolo VIII

Batteri difficilmente coltivabili

Borreliae

Le borrelie fanno parte della famiglia delle *Spirochaetaceae*, a cui appartiene anche il *Treponema pallidum*, responsabile della sifilide o lue, malattia a trasmissione sessuale o congenita (dalla madre infetta al figlio), che non viene trattato in questo manuale in quanto l'indagine batteriologica si limita all'esame diretto per la ricerca del batterio nelle lesioni tipiche con l'impiego del microscopio in campo oscuro, o all'impiego del metodo di fluorescenza diretta; infatti il *T. pallidum* non cresce sui normali terreni di coltura, ma solo in vivo dopo inoculazione in animali (testicolo di coniglio) e la diagnosi d'infezione si basa quasi esclusivamente sulla ricerca d'anticorpi specifici.

Le borrelie hanno la caratteristica forma spiraliforme tipica delle spirochete, sono mobili con movimenti elicoidali, con cellula molto sottile ma molto lunga (fino a 25 μm) che si colora in rosso al Gram, ma sono difficilmente visibili a causa appunto del ridotto diametro cellulare, per cui per osservarle bene bisogna ricorrere ad altre colorazioni quali l'impregnazione argentrica.

A differenza di altre spirochete le borrelie sono trasmesse all'uomo da artropodi vettori (vari tipi di zecche e pidocchio del corpo), che le assumono da animali (soprattutto roditori) o dall'uomo infetti, di cui succhiano il sangue.

Isolamento

La maggior parte delle borreliosi viene diagnosticata individuando le spirochete nel sangue del paziente o dell'animale, guardandone una goccia al microscopio in campo scuro oppure colorandone uno striscio sottile su vetrino con la colorazione di Giemsa o Wright o con l'impregnazione argentrica. Nella borreliosi di Lyme invece di solito non si ha una presenza di spirochete nel sangue ed allora si ricorre a biopsie di tessuto cutaneo su cui si eseguono colorazioni appropriate.

È possibile eseguire la coltura su terreni liquidi che può diventare positiva in tempi oscillanti da alcuni giorni a mesi.

Tuttavia la coltura è destinata a centri di riferimento e la diagnosi di laboratorio si limita alla ricerca degli anticorpi con vari test sierologici: in assenza di un campione della fase acuta si può comunque fare diagnosi se il titolo riscontrato supera il valore di riferimento del metodo (tecnica IFA o Elisa). Purtroppo però anche questi test soffrono di una bassa specificità potendo dare risultati non affidabili ed anche con l'impiego della tecnica di "Western blot" i problemi non sono stati completamente risolti.

Si consiglia quindi, in casi difficili o con dubbi diagnostici, d'inviare i campioni biologici in centri specializzati, in considerazione anche del piccolo numero di richieste che di solito sono fatte al laboratorio e che rendono non economica la diagnosi.

Bartonellae

Sono piccoli bastoncini Gram negativi, aerobi, ossidasi negativi che crescono con difficoltà anche nei terreni per germi esigenti e necessitano di CO₂ per la crescita.

Le specie più importanti sono:

B. bacilliformis, *B. quintana* (in precedenza nota come *Rickettsia quintana*) e *B. henselae* (nota anche come agente della malattia “da graffio di gatto”).

Isolamento

Anche per le bartonelle si ricorre ai metodi sierologici per la ricerca anticorpale, lasciando l'esame colturale, lungo, difficile e che necessita di terreni preparati freschi, a centri specializzati.

Le tecniche impiegate sono immunofluorescenza e test immunoenzimatici.

Leptospiraceae

A questo genere appartengono batteri aerobi, mobili, con morfologia a spirale, molto sottili ma piuttosto lunghi (6-12 µm), Gram negativi ma osservabili con difficoltà al microscopio ottico proprio per le ridotte dimensioni del diametro della cellula e visibili meglio con l'impiego del microscopio in campo scuro o con quello a contrasto di fase.

Alcune specie vivono liberamente nell'ambiente dove sono in grado di sopravvivere per mesi, mentre altre sono ospiti degli animali (cani, bestiame, suini, roditori quali il ratto ed il topo) che possono essere anche portatori asintomatici del batterio e dai quali può passare all'uomo: infatti la leptospirosi è una vera zoonosi.

Isolamento

I materiali biologici più rilevanti sono il sangue, il liquor e le urine. È importante ricordare che la leptospirosi è una malattia che inizia con una fase setticemica che dura da 4 a 7 giorni, in cui le leptospire si disseminano in vari organi ed in questo periodo l'emocoltura è l'esame più importante. Dopo un breve periodo in cui si ha un inizio di risposta immunitaria dell'ospite, parte la fase secondaria che può essere anitterica o itterica (più grave), con interessamento meningitico in circa la metà dei casi e con presenza di leptospire nelle urine nella quasi totalità dei pazienti infetti. Pertanto in questo periodo sono diagnostici l'urinocoltura e la ricerca d'anticorpi specifici. È importante ricordare d'eseguire gli esami colturali prima dell'inizio della terapia antibiotica e mentre il paziente è ancora febbrile. Se non sono disponibili in laboratorio i terreni di coltura il sangue deve essere raccolto in provette contenenti eparina, ma non citrato di sodio perché quest'ultimo inibisce la crescita delle leptospire.

Inoltre la semina dei campioni deve essere eseguita il più precocemente possibile, in particolare in caso di urine acide perché a questo pH le leptospire sono inibite o sopravvivono solo per poche ore.

Identificazione

Si può fare un esame diretto dei campioni osservandone una goccia al microscopio in campo scuro e con l'impiego d'anticorpi marcati con fluoresceina.

È necessario comunque eseguire anche una coltura su un terreno specifico (ad esempio terreno di Fletcher) seminandone solo una o due gocce di sangue o poche gocce d'urina o liquor, incubando a temperatura ambiente ed esaminando al microscopio in campo scuro una goccia di terreno almeno una volta la settimana per alcuni mesi prima di considerare negativo il campione. Impiegando terreni semisolidi, in caso di positività si osserva una crescita diffusa sulla superficie del terreno.

Poiché si tratta di tecniche particolari, di raro impiego nella pratica giornaliera e che necessitano di terreni preparati freschi è opportuno che il laboratorio non specializzato in questa ricerca si rivolga a centri di riferimento regionali o nazionali.

Per tali motivi il laboratorio di microbiologia si limita a fare una diagnostica indiretta per la ricerca d'anticorpi impiegando tecniche immunoenzimatiche o di immunofluorescenza.

Tuttavia possono verificarsi problemi d'interpretazione dei risultati ottenuti per cui è preferibile, in caso di dubbio, contattare comunque i centri di riferimento.

Rickettsiae

Sono batteri di dimensioni molto ridotte con diametro di 0,3-0,5 μm , pleiomorfi, Gram negativi (ma la colorazione non è utilizzabile per il loro riconoscimento da materiali biologici), parassiti intracellulari obbligati, che muoiono facilmente al di fuori dell'ospite.

Di norma vengono trasmessi all'uomo da alcuni artropodi (pulci, pidocchi, zecche) che ne costituiscono il serbatoio naturale, causando quadri clinici talora anche molto gravi accompagnati spesso da esantemi e febbre.

Isolamento

Solo i laboratori di ricerca specializzati eseguono la ricerca diretta delle *rickettsiae*.

Di norma ci si limita alla ricerca degli anticorpi specifici che può essere fatta con varie tecniche: reazione di Weil-Felix (poco specifica e poco sensibile), immunofluorescenza ed Elisa. Tuttavia i risultati ottenuti debbono essere vagliati dal medico in base al quadro clinico presentato dal paziente ed alla sua evoluzione nel tempo, ripetendo il test per verificare l'andamento anticorpale ed un'eventuale sierconversione.

Coxiellae

Coxiella burnetii è responsabile della malattia nota come "febbre Q", trasmessa all'uomo, per via respiratoria, da animali o da loro organi infetti.

Sono batteri a forma di corti coccobacilli di grandezza simile alle *rickettsiae*, ma, a differenza di queste, molto più resistenti nell'ambiente esterno.

Anche per loro la diagnostica si limita alla ricerca di anticorpi con immunofluorescenza o fissazione del complemento.

Capitolo IX

Batteri anaerobi

Caratteristiche generali

Sono chiamati batteri anaerobi quei microrganismi che, di norma, non sono in grado di svilupparsi in presenza dell'ossigeno atmosferico: si definiscono pertanto anaerobi obbligati e necessitano di sistemi di coltura particolari (cappe per anaerobi o giare in cui ottenere un'atmosfera anaerobia con vari dispositivi necessari per produrre un ambiente a basso potenziale ossido-riduttivo, ottimale per la loro crescita) [►FOTO].

Tuttavia essi comprendono una vasta gamma di batteri che presentano diverse sensibilità all'ossigeno atmosferico, in quanto esistono stipiti capaci di crescere, seppure con difficoltà, sulla superficie di terreni incubati in aerobiosi, ed altri che sono incapaci di sopravvivere anche in presenza di piccole quantità d'ossigeno ambientale o nel mezzo di coltura.

Gli anaerobi sono presenti come saprofiti, talora in cariche estremamente elevate, in numerose sedi del nostro organismo, in particolare nel cavo orale e nelle alte vie respiratorie, nel tratto intestinale, e nell'apparato genito-urinario e da queste sedi possono passare nel circolo sanguigno e dare setticemie o altre gravi infezioni. Infatti la modalità più frequente di infettarsi con i germi anaerobi è proprio per via endogena, cioè con una flora batterica residente nel soggetto la quale, per vari motivi, riesce a superare le normali barriere difensive ad essi preposte e causa malattia. Tuttavia si può contrarre un'infezione da anaerobi anche per via esogena, cioè da fonti esterne all'organismo stesso e trasmessa dall'ambiente (fonte tellurica), dove sopravvivono per molto tempo, in particolare alcune specie sporigene come i clostridi (*Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, ecc.).

I batteri anaerobi comprendono numerosi generi e specie che possono presentarsi sotto varie forme (bastoncelli, filamenti, coccobacilli, cocchi), Gram positivi o Gram negativi.

In alcune occasioni non è sempre facile distinguere la morfologia e la colorazione dei batteri che si può modificare anche in base al tipo di terreno su cui crescono (brodo o agar): allora per avere una conferma si può seminare il ceppo su una piastra di agar sangue apponendo poi sopra un disco di vancomicina da 5 µg intorno al quale potranno crescere solo i Gram negativi.

Il numero d'infezioni provocato dai germi anaerobi è percentualmente molto più basso di quelle provocate dagli aerobi, anche se esistono spesso infezioni miste in cui sono contemporaneamente presenti entrambi i tipi di batteri.

Le infezioni più comuni da essi causate sono: endometriti, appendiciti, peritoniti, infezioni post-chirurgiche, ascessi renali, ascessi polmonari, polmonite “ab ingestis”, ed empiemi pleurici.

Per la loro ricerca è indispensabile seguire alcune norme per un prelievo corretto del campione e per la sua conservazione prima della semina, che deve comunque essere fatta rapidamente dopo la raccolta, specie se non si dispone di idonei sistemi di trasporto e conservazione. Infatti, esistono alcuni anaerobi, in particolare quelli Gram negativi asporigeni, che sono estremamente sensibili all'ossigeno atmosferico e muoiono dopo essere stati esposti per poco tempo all'aria.

Quindi se la semina non può essere fatta direttamente al letto del malato bisogna raccogliere i materiali solidi (pus, sierosità scarse, ecc.) con tamponi particolari che si inseriscono in contenitori idonei con un opportuno terreno di trasporto, dove gli anaerobi possono sopravvivere per qualche ora. I materiali liquidi (sangue, liquidi provenienti da organi o cavità interne di norma sterili) si trasferiscono di solito con siringa sterile in flaconi con atmosfera anaerobia, contenenti un terreno riducente.

È buona norma, in caso di richiesta di ricerca di germi anaerobi, seminare anche dei terreni colturali per la ricerca di germi aerobi per verificare se in quel campione esistono solo germi anaerobi oppure sono presenti anche gli aerobi o anaerobi facoltativi.

È opportuno, in presenza di sufficienti quantità di materiale, allestire anche uno striscio batterioscopico da colorare al Gram per avere immediatamente una visione del tipo di flora batterica presente nel campione perché, se il campione non è conservato con le modalità previste, quella anaerobia potrebbe non crescere in coltura per la morte dei microrganismi.

Inoltre l'immagine microscopica permette da un lato d'informare rapidamente il clinico sulla tipologia dei batteri osservati permettendogli d'iniziare una terapia antibiotica empirica, e, dall'altro, di scegliere gli opportuni terreni di coltura per la semina del campione.

I materiali biologici su cui si può correttamente eseguire una ricerca per germi anaerobi sono i seguenti:

- a) campioni di norma sterili: sangue, liquor, liquido pleurico e di altre cavità corporee, tessuti asportati chirurgicamente;
- b) pus da raccolte maleodoranti in varie sedi anatomiche (cervello, fegato, tube ed ovaio, ecc.);
- c) tamponi prelevati da ferite post-operatorie e da ulcere profonde.

Un valido indizio della presenza di germi anaerobi nel campione biologico è la presenza di un odore fetido determinato dal metabolismo batterico che produce acidi organici volatili, e che si sente anche aprendo le giare dopo l'incubazione in termostato delle piastre di coltura.

La ricerca per anaerobi non deve essere invece, di norma, eseguita dai seguenti campioni: tamponi naso-faringei e faringei, espettorato e broncoaspirato, sedi corporee contaminate da materiale fecale, feci (tranne che per la ricerca del *Clostridium difficile*), urina, materiali vaginali e cervicali, campioni provenienti da ferite superficiali.

La semina dei campioni deve essere fatta su terreni al sangue contenenti vitamina K, emina e cistina, che facilitano la loro crescita, accoppiando anche una piastra dello stesso tipo ma con aggiunta di antibiotici, in genere vancomicina e kanamicina, impiegati per l'isolamento delle specie di *Bacteroides* e per l'inibizione di gran parte dei germi Gram positivi, o agar con alcol feniletico, che favorisce in particolare la crescita dei cocchi Gram positivi ed inibisce quella dei batteri Gram negativi anaerobi facoltativi incluso il *Proteus*, che può determinare problemi con la sua tipica sciamatura sulla superficie del terreno.

Utile può essere l'impiego di un terreno al sangue con CNA (colistina ed acido nalidixico) per l'isolamento dei cocchi Gram positivi.

Bisogna ricordare che la crescita degli anaerobi avviene decisamente meglio ed è più rigogliosa se il terreno è preparato da poco. Ciò vale anche per i terreni liquidi, in particolare per il brodo al tioglicollato che in breve tempo perde le sue caratteristiche per l'azione ossidante dell'ossigeno atmosferico: in tal caso si può ottenere di nuovo un terreno ridotto bollendo le provette di brodo a bagno maria con i tappi allentati e lasciandole poi raffreddare richiudendo bene i tappi.

Sarebbe comunque opportuno, prima della semina e non disponendo di una cappa per anaerobi, mettere le piastre o i brodi necessari alla semina nella giara per anaerobi per almeno 24 ore.

I tempi di crescita degli anaerobi sono più lunghi di quelli necessari per la crescita degli aerobi o anaerobi facoltativi e l'incubazione deve essere sempre prolungata per un minimo di 48-72 ore.

Se si desidera fare delle subcolture è necessario operare rapidamente per impedire l'azione dannosa dell'ossigeno atmosferico sulle specie più sensibili, reincubando poi le piastre sempre in atmosfera anaerobia. L'ottimale sarebbe disporre di cappe anaerobiche, completamente isolate dall'esterno, in cui si produce un'atmosfera anaerobia con una miscela di gas contenuti in bombole ed all'interno della quale si eseguono tutte le operazioni di semina, subculture, identificazione, antibiogramma.

L'identificazione dei vari stipiti non è sempre agevole anche disponendo dei sistemi pronti del commercio, perché non sempre danno risultati affidabili: pertanto il microbiologo che opera in questo settore deve acquisire una buona esperienza professionale per essere in grado di dare risposte affidabili per il clinico.

Inoltre non sempre è facile ottenere l'isolamento degli anaerobi, soprattutto se le specie interessate sono più di una o se si trovano insieme a germi anaerobi facoltativi, che possono prendere il sopravvento nella crescita o che possono rendere difficile il loro riconoscimento.

È importante ricordare inoltre che la tassonomia di questi microrganismi è in continua evoluzione per cui bisogna adeguarsi anche ai nuovi criteri classificativi nella definizione dello stipite isolato.

In casi di dubbi diagnostici, specie in presenza di quadri clinici di una certa gravità che necessitano di una terapia antibiotica mirata, è necessario cercare la conferma con altri metodi (ad esempio gas cromatografia), oppure inviando lo stipite in un centro di riferimento o che comunque esegue di routine le colture per germi anaerobi.

Cocchi Gram positivi

I cocchi anaerobi Gram positivi più frequentemente responsabili d'infezioni nell'uomo appartengono al genere *Peptostreptococcus* e *Peptococcus* che costituiscono parte della flora indigena della cavità orale, della pelle, e dei tratti intestinale e genito-urinario.

Sono considerati responsabili d'infezioni in vari organi o apparati, comportandosi spesso come opportunisti in grado di dare infezioni se si abbassano le difese locali o sistemiche dell'ospite, oppure in corso d'interventi chirurgici.

La coltura dei materiali si esegue su piastre al sangue di montone con e senza sostanze per selezionarli da una concomitante flora mista, incubandone una parte in atmosfera anaerobia ed una in capnofilia. Su agar sangue le colonie si presentano da grigie a biancastre, dopo 48-72 ore d'incubazione, solo occasionalmente emolitiche.

Alla colorazione di Gram si notano cocchi in catene per il genere *Peptostreptococcus* oppure a grappoli per il genere *Peptococcus*.

Cocchi Gram negativi

Si presentano al Gram come cocchi a diploidi, in corte catene o ammassi. Sono presenti prevalentemente nella cavità orale e sono implicati in infezioni del polmone o della pleura o addominali. Sono rappresentati dal genere *Veillonella*.

Crescono solo su terreni al sangue formando colonie piccole, traslucide, convesse, di colore dal bianco al giallastro. A differenza dei cocchi anaerobi Gram positivi, crescono bene su piastre di agar sangue contenenti kanamicina e vancomicina. In brodo al tioglicollato si osserva una crescita sottile, diffusa con produzione di bolle di gas.

Bacilli Gram positivi asporigeni

A questo gruppo appartengono varie specie quali *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Mobiluncus*.

La maggior parte di essi sono anaerobi obbligati, ma altri sono anaerobi facoltativi o microaerofili (ad esempio i lattobacilli possiedono specie dei vari tipi).

Costituiscono parte della flora normale presente sulle membrane mucose o della pelle: tra questi ultimi i *Propionibacterium* sono responsabili di contaminazioni dei flaconi per emocoltura se prima del prelievo di sangue non è stata fatta un'accurata disinfezione della cute, determinando talora una positività della coltura anche nei flaconi per aerobi e che, a causa della lenta crescita, può essere segnalata dalla macchina alla fine del periodo d'incubazione, che di solito si protrae per una settimana.

All'esame microscopico si presentano sotto varie forme, quali coccobacilli con presenza o meno di granuli metacromatici, bastoncelli allungati, o con estremità separate

con biforcazione o sottili filamenti con o senza presenza di ramificazioni. Pertanto non è sempre facile individuare o sospettare il microorganismo in base alla sola colorazione di Gram, potendo essere facilmente confusi con altri batteri Gram positivi aerobi o anaerobi facoltativi.

Inoltre alcuni di questi batteri anaerobi si possono presentare in forme diverse da quelle tipiche perché hanno la tendenza a formare delle piccole cellule coccobacillari che possono essere facilmente confuse come cocci. Altri possono essere eccessivamente decolorati al Gram e quindi apparire Gram negativi determinando un'identificazione non corretta per il gruppo dei *Bacteroides* o dei *Fusobacterium*.

Le infezioni provocate comprendono l'actinomicosi (polmonare, addominale e cervico facciale), ascessi in vari organi interni, parodontopatie, endocarditi, osteomieliti, e morsi di animali. A differenza degli altri anaerobi l'espettorato costituisce un campione appropriato per la ricerca degli actinomiceti.

Actinomyces

Sono responsabili dell'actinomicosi, malattia infettiva che è caratterizzata dalla produzione di pus che può drenare spontaneamente all'esterno e presenta spesso dei caratteristici granuli (granuli di zolfo) costituiti da un ammasso di batteri filamentososi e ramificati: hanno la grandezza di 4-6 mm di diametro, sono di consistenza dura, e presentano un colore tra il bianco ed il giallo.

La ricerca è eseguita anche sull'espettorato per le infezioni polmonari o sul liquido pleurico. Sono ritenuti responsabili anche d'infezioni pelviche specie in donne che usano la spirale uterina come mezzo contraccettivo interno.

In presenza dei granuli è sufficiente la conferma microscopica ponendone uno su un vetrino portaoggetti con una goccia di acqua distillata sterile, aggiungere un coprioggetti, schiacciarlo leggermente ed osservare a fresco la presenza dei tipici filamenti [► FOTO].

La specie più frequentemente isolata è l'*Actinomyces israelii* che, insieme a *A. bovis* e *A. meyeri*, è un anaerobio stretto, mentre gli altri actinomiceti sono anaerobi facoltativi, anche se crescono meglio in condizioni di anaerobiosi al primo isolamento.

Si può eseguire una coltura, oltre che sui terreni tipici per anaerobi, anche su un terreno selettivo contenente agar per actinomiceti con aggiunta di metronidazolo (5 µg/ml), sul quale viene strisciato il tampone usato per il prelievo del materiale, precedentemente mantenuto per 24 ore in *cooked-meat broth*. La piastra è incubata a 37 °C per almeno 4 settimane osservando ogni settimana l'eventuale crescita.

Su agar sangue le colonie di *A. israelii* sono biancastre, con superficie rugosa, a forma di cavolfiore, a crescita lenta.

L'identificazione delle varie specie può essere difficile con i sistemi commerciali manuali o automatici, che evidenziano alcune caratteristiche biochimiche e fermentative sugli zuccheri dei ceppi ma che non sempre danno reazioni nette. Risultati decisamente migliori si ottengono con l'impiego della gascromatografia, tecnica complessa destinata ai soli laboratori specialistici o con alti carichi di lavoro per gli anaerobi.

Bifidobacterium

Si presentano come bastoncini spesso con le estremità biforcute [►FOTO], caratteristica morfologica simile però ad altri generi. Sono immobili.

Sono presenti nella cavità orale, nell'intestino, in vagina e sono stati isolati anche da materiali prelevati dall'apparato respiratorio. Sono raramente causa d'infezione e l'unico con una certa potenzialità patogena sembra essere *B. dentium*.

Eubacterium

Si presentano come bastoncini che si trovano nella cavità orale, nell'intestino e nel suolo.

Causano raramente infezioni quali ascessi, malattie periodontali, pelviche.

Lactobacillus

Il 20% di questi microrganismi è anaerobio obbligato. La descrizione dettagliata del genere è indicata in precedenza, nel capitolo dei bacilli Gram positivi aerobi.

Mobiluncus

Sono batteri che presentano una morfologia tipicamente a virgola o ad "ali di gabbiano" e che alla colorazione di Gram possono essere variabili, ma sono sensibili alla vancomicina e resistenti alla colimicina, caratteristiche che li fanno inserire tra i Gram positivi.

Sono catalasi, ossidasi ed indolo negativi.

Sono mobili, strettamente anaerobi, difficilmente coltivabili e lenti nella crescita.

Le colonie su agar sangue sono lisce, incolori, traslucide, grandi appena 2-3 mm dopo 5-6 giorni di incubazione.

Si ritrovano nell'apparato genitale e nell'intestino. Il loro potenziale di patogenicità nelle infezioni dell'apparato genitale femminile (vaginosi batterica) non è ancora stato chiarito e spesso si trovano in associazione con *Gardnerella vaginalis*.

Propionibacterium

Sono batteri commensali presenti nella pelle, nella cavità orale e nell'intestino. Si presentano sotto forma di coccobacilli simili morfologicamente ai difteroidi e quindi difficilmente differenziabili al Gram [►FOTO].

P. acnes è isolato con una certa frequenza dai flaconi dell'emocoltura dove, in genere, è considerato un contaminante [►FOTO].

Tuttavia è stato confermato avere un ruolo patogeno in vari quadri morbosi, quali infezioni del sistema nervoso, delle articolazioni e delle ossa, nella patogenesi dell'acne vulgaris ed infezioni successive all'impianto di cateteri endovascolari.

Pertanto anche in questo caso il microbiologo deve essere in contatto con il clinico per avere una conferma dell'eventuale ruolo patogeno del batterio.

Bacilli Gram positivi sporigeni

Sono ampiamente diffusi in natura e nell'intestino dell'uomo e di altri animali come flora residente normale. Producono spore con le quali riescono a sopravvivere per molto tempo in condizioni avverse. Le spore danno un'indicazione della specie batterica perché si trovano in posizioni particolari della cellula (centrale, terminale o sub-terminale).

Alcuni sono anaerobi stretti, altri tolleranti all'ossigeno (alcuni ceppi di *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. tertium*) tanto che potrebbero essere confusi con i batteri aerobi del genere *Bacillus*, ma distinguendosi da loro perché i clostridi di norma producono spore solo in condizioni di anaerobiosi e comunque sono catalasi negativi. Sono anche ossidasi negativi.

Si presentano come bastoncini tozzi o allungati o curvati, quindi con una forma che varia da corti coccobacilli a filamenti allungati e filamentosi, singoli, appaiati o in catene, in genere mobili.

Di norma sono Gram positivi in particolare agli inizi della crescita, ma alcune specie sono Gram negative [►FOTO].

Le specie che interessano la patologia umana non sono molte e possono agire in due modi: o per produzione di potenti esotossine, che sono le responsabili del quadro clinico tipico di quella particolare infezione (tetano, botulismo) o causare una malattia invasiva con distruzione dei tessuti e progressione ad altri organi contigui, estremamente grave se non si fanno interventi risolutivi e rapidi.

Clostridium perfringens

Sono bastoncini Gram positivi, anaerobi stretti o aero tolleranti, immobili, che producono spore ovoidali situate in posizione centrale o sub terminale, che deforma la cellula batterica, solo raramente osservabili in vitro. Sono ampiamente diffusi nell'ambiente ma anche nell'intestino dell'uomo e di alcuni animali: per questo motivo l'isolamento da campioni clinici deve essere attentamente valutato per accertarsi della vera responsabilità dello stipite isolato nell'eziologia dell'infezione. È fondamentale contattare il clinico per avere una conferma o per richiedere un ulteriore campione per l'esame colturale.

Possono causare cellulite, sepsi intraddominale, batteriemia, polmonite necrotizzante, ascessi cerebrali, mionecrosi (gangrena gassosa). Sono in grado di produrre una varietà di tossine che giocano un ruolo importante nella patogenicità del batterio. Possono determinare anche gravi gastroenteriti per ingestione di cibi contaminati da ceppi del tipo A, grazie alla sopravvivenza delle spore negli alimenti ed alla successiva produzione della enterotossina che causa la sintomatologia clinica.

È la specie di clostridio più frequentemente incontrata nei campioni biologici inviati per l'esame colture, se si escludono le feci.

L'isolamento deve essere eseguito ponendo i terreni colturali (agar sangue Columbia, agar Schaedler, ecc.) nelle apposite giare dov'è prodotta un'atmosfera priva d'ossigeno.

È bene prolungare l'incubazione in termostato per almeno 48 ore.

Su agar sangue di montone le colonie sono circondate da una zona di emolisi completa all'interno ed incompleta nella parte più esterna [►FOTO].

Per l'identificazione si possono impiegare vari kit del commercio con buoni risultati mentre per l'identificazione della tossina è opportuno ricorrere a centri di riferimento. L'antibiogramma in genere non si esegue, in quanto il batterio risulta sensibile alla penicillina che è il farmaco di scelta anche se sono stati segnalati in aumento i ceppi resistenti. Altri antibiotici attivi sono: cloramfenicolo, piperacillina, imipenem, inibitori delle β -lattamasi, metronidazolo.

Clostridium botulinum

Causa una malattia nota come botulismo provocata da tossine prodotte dai ceppi tossigenici.

Il batterio è diffuso nell'ambiente: le spore sono in grado di sopravvivere anche a temperatura d'ebollizione dell'acqua e questo fatto spiega gli sporadici episodi di malattia che avvengono in consumatori di conserve alimentare prodotte in casa (tossinfezione alimentare).

In alcuni casi si ha un'infezione non per ingestione della esotossina preformata ma per l'introduzione di spore con gli alimenti (in particolare è stato incriminato il miele) con produzione di tossina direttamente nell'intestino e con sintomatologia clinica in genere meno grave della precedente.

La diagnosi dell'infezione è di tipo clinico e comunque l'individuazione delle tossine è eseguita in centri specializzati.

Clostridium tetani

Causa il tetano, malattia spesso fatale prima dell'introduzione della vaccinazione antitetanica di massa.

Il batterio è ampiamente diffuso nell'ambiente e nell'intestino di numerosi animali.

Le spore [►FOTO], penetrate nell'organismo, in genere in seguito ad una ferita profonda, fanno nascere la forma vegetativa che produce una potentissima tossina neurotossica, chiamata tetanospasmina, che è la responsabile della classica malattia del tetano, anche in questo caso diagnosticata solo clinicamente.

Clostridium difficile

È un batterio la cui azione patogena è stata riconosciuta verso la fine degli anni '40, ma solo a partire dagli anni '70 ha cominciato ad interessare la patologia umana in quanto è stato dimostrato direttamente responsabile di quadri gastroenterici di varia gravità fino alla colite pseudomembranosa, in particolare in ambiente ospedaliero, dove si sono avute in più occasioni piccoli episodi epidemici, soprattutto in pazienti

sottoposti ad interventi operatori in sede addominale o a terapia con particolari antibiotici (lincomicina, clindamicina, β -lattamici).

La facilità di diffusione delle spore, specie dopo un episodio gastroenterico, rende difficile il controllo dell'infezione se non sono rispettate rigorose norme igieniche e di comportamento da parte del personale sanitario operante nel reparto.

La patologia è dovuta alla produzione di tossine (enterotossina o tossina A e citotossina o tossina B) che di solito sono prodotte insieme ma ne può essere formata una sola.

In passato si ricercava il batterio nelle feci diarroiche (10-20 ml) ma, poiché è dimostrato che esistono ceppi non produttori di tossina, è oggi obbligatorio eseguire la ricerca delle tossine con metodi commerciali o con l'impiego di colture cellulari.

La coltura dalle feci si esegue impiegando terreni selettivi come il CCFA (cicloserina, cefoxitina, fruttosio agar): o altri terreni selettivi contenenti sangue [►FOTO], facendo precedere la semina delle feci da un trattamento preliminare (shock termico o etanolic) per ridurre la flora non sporigena.

Si presentano come bacilli Gram positivi che tendono a perdere, in parte, il colore in alcune cellule. La colorazione di Gram direttamente di una piccola porzione di feci diarroiche evidenzia spesso grossi elementi bastoncellari Gram positivi, talora con evidenti spore all'interno, spesso con presenza di frequenti o numerose blastospore o ife di *Candida*.

L'esame batterioscopico, anche se indicativo, non è comunque sufficiente per la diagnosi.

Bacilli Gram negativi

Questo gruppo di batteri comprende le specie che sono più frequentemente riscontrate da campioni clinici.

Anch'essi costituiscono parte della flora normale della bocca, dell'intestino, delle alte vie respiratorie e dall'apparato genito urinario dell'uomo e degli animali.

Ad essi appartengono i generi *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyromonas* ed il *Campylobacter*, che è già stato trattato in precedenza.

Si differenziano dai batteri anaerobi facoltativi, molto simili in alcuni casi con la colorazione di Gram, per l'incapacità di crescere in atmosfera contenente ossigeno ed, in genere, per la sensibilità al metronidazolo, farmaco efficace proprio sulla flora anaerobia.

I vari generi si possono differenziare, oltre che per le caratteristiche colturali e microscopiche, anche per altre proprietà che ne permettono un'identificazione presuntiva quali ad esempio: motilità, catalasi, lipasi, impiego di alcuni antibiotici partendo da una sospensione del ceppo isolato in brodo al tioglicollato seminata su una piastra al sangue (disco di colistina da 10 μ g, eritromicina da 60 μ g, kanamicina da 1000 μ g, rifampicina da 15 μ g, vancomicina da 5 μ g e penicillina da 2 U). Da ricordare che la sensibilità del ceppo si considera tale se l'alone d'inibizione della crescita è > di 10 mm.

Bacteroides

La specie in assoluto più frequentemente in causa in infezioni anaerobie è il *Bacteroides fragilis*, che si presenta sotto forma di elementi bastoncellari spesso pleiomorfi ed irregolarmente colorati al Gram.

È resistente alla bile e questa proprietà può essere utilizzata in terreni selettivi per un suo isolamento da una flora mista ed è, in genere, molto resistente agli antibiotici.

Su agar sangue Schaedler la crescita è rapida (in genere positiva in 24 ore) con colonie piccole convesse, non emolitiche, bianco grigiastre e traslucide.

Fusobacterium

Si incontra con una certa frequenza nei campioni biologici e la specie più isolata è *Fusobacterium necrophorum*, caratterizzata dalla gravità delle infezioni provocate, spesso ad insorgenza dall'orofaringe.

Su agar sangue Schaedler le colonie si presentano circolari, convesse, lisce, di piccole dimensioni, umbonate con centro opaco e bordi traslucidi. Alla colorazione di Gram il batterio si presenta sotto forma di filamenti caratteristici allungati con un tipico rigonfiamento centrale e si colora in modo irregolare.

Prevotella

A questo genere appartiene *Prevotella melaninogenica*, in precedenza classificato come *Bacteroides melaninogenicus*, che rappresenta la specie più frequentemente isolata in campioni clinici.

La caratteristica più saliente della specie è la produzione di un pigmento marrone scuro, quasi nero, che si evidenzia dopo alcuni giorni di crescita direttamente alla lettura della piastra o prelevando le colonie con un tampone sterile.

Presentano un'attività saccarolitica a differenza del genere *Porphyromonas* che non la possiede pur producendo anch'esso un pigmento scuro.

Porphyromonas

Sono batteri a forma di coccobacillo [►FOTO] prevalenti nel tratto intestinale ed urogenitale e, alcune specie, nel cavo orale. Sono state isolate anche da ferite causate da morso d'animali.

Caratteristiche differenziali di alcune specie di bacilli anaerobi Gram negativi

Specie	Motilità	Catalasi	Lipasi	Sensibilità a					
				Colistina	Eritromicina	Kanamicina	Rifampicina	Vancomicina	Penicillina
<i>B. fragilis</i>	Neg	+/-	Neg.	R	S	R	S	R	R
<i>P. melaninogenica</i>	Neg.	Neg	+/-	S/R	S	R	S	S/R	S
<i>E. necrophorum</i>	Neg.	Neg.	Pos.	S	S	S	S	R	S

Capitolo X

Mycobacteriaceae

Caratteristiche generali

I micobatteri comprendono patogeni obbligati, patogeni opportunisti e microrganismi ambientali con ridotta possibilità di provocare infezioni nell'uomo.

I micobatteri sono bacilli Gram positivi, non mobili e non sporigeni che possono misurare da 0,2 a 0,6 μm di larghezza e da 1 a 10 μm di lunghezza. Le colonie si sviluppano molto più lentamente, in confronto ad altri batteri, e possono presentarsi rugose o lisce, in molte specie sono pigmentate e fra di esse alcune presentano il pigmento solo dopo esposizione alla luce.

Sono molto resistenti all'essiccamento, agli acidi, alle basi ed a molti disinfettanti; sono invece uccisi dal calore e dai raggi ultravioletti.

I micobatteri presentano alcune caratteristiche, la peculiare composizione lipidica della parete e la lentezza del ritmo riproduttivo in primo luogo, che, distinguendoli da tutte le altre specie microbiche, rendono indispensabile il ricorso a tecniche diagnostiche diverse da quelle comunemente impiegate per la ricerca di altri microrganismi. Le caratteristiche qualitative e quantitative della componente lipidica della parete, ove sono presenti acidi micolici a catena lunga e fenol-glicolipidi e in cui i grassi costituiscono oltre il 60% del peso secco, sono alla radice del fenomeno della alcol-acido resistenza che contraddistingue i micobatteri. La lentezza di crescita comporta invece il ricorso a terreni e tecniche particolari per la coltura, l'identificazione e la determinazione della sensibilità ai farmaci.

Il *M. tuberculosis* complex è un raggruppamento che include le specie responsabili della tubercolosi nell'uomo e negli animali (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii*) nonché la variante *M. bovis* BCG impiegata per la vaccinazione antitubercolare e occasionalmente coinvolta in patologie iatrogene. Altre specie patogene sono il *M. leprae*, agente eziologico della lebbra, ed il *M. ulcerans* responsabile di gravi ulcerazioni cutanee.

Delle specie rimanenti, circa un centinaio, solitamente indicate con l'acronimo NTM (nontuberculous mycobacteria), molte sono state segnalate, con una certa frequenza, come responsabili di infezioni umane. Le micobatteriosi più frequenti sono dovute a *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. celatum* e *M. scrofulaceum*. Le patologie più frequenti sono quelle respiratorie, ma meritano di essere ricordate anche le linfadeniti e le infezioni cutanee, osteo-articolari e disseminate (particolarmente frequenti nei soggetti immunodepressi). Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche fenotipiche salienti delle specie più comuni.

Modalità di prelievo e norme di sicurezza

La ricerca di micobatteri può essere eseguita su qualsiasi materiale biologico. I campioni clinici devono essere inviati quanto prima in laboratorio o, qualora ciò non sia possibile, conservati in frigorifero. Per dettagli sulle modalità di prelievo si veda la Tabella 2.

Il *M. tuberculosis*, per la sua pericolosità, è collocato dal Decreto Legge n. 626 nel gruppo 3. Si stima che l'incidenza dell'infezione tubercolare sia da tre a nove volte superiore nel personale di laboratorio rispetto a chi esercita altre attività lavorative.

Gli aerosol costituiscono il più importante fattore di rischio di infezione da *M. tuberculosis* per il personale di laboratorio. Le più comuni manovre che determinano aerosol comprendono la manipolazione ed il flambaggio di anse, oggi non più necessario grazie all'uso di anse monouso sterili in plastica, l'agitazione di sospensioni batteriche, la centrifugazione di materiale infetto, soprattutto quando si verifica un danneggiamento dei contenitori durante l'operazione, l'utilizzo di omogeneizzatori e vortex su campioni clinici o colture, il versamento o il travaso di brodocolture, l'apertura di contenitori con tappo a pressione.

L'infezione per ingestione può verificarsi soprattutto in seguito a pipettaggio a bocca e all'ingestione di cibo o bevande nelle aree di lavoro.

L'inoculazione si verifica generalmente in seguito alla manipolazione di aghi e siringhe.

In aggiunta alle normali misure di sicurezza è richiesta, nel laboratorio di micobatteriologia, l'adozione di alcune pratiche speciali.

Tutti i campioni, le colture e i materiali contaminati devono essere decontaminati prima di essere eliminati. Vanno posti in sacche di plastica a tenuta per essere autoclavati o inceneriti.

Le porte del laboratorio devono essere tenute chiuse.

In caso di incidenti con versamento di colture micobatteriche occorre evacuare l'area per almeno 30 minuti chiudendo le porte, per permettere all'aerosol di depositarsi. Occorre coprire il materiale versato con un panno assorbente imbevuto di disinfettante. Possono essere impiegati ipoclorito di sodio (10.000 ppm di cloro libero), composti fenolici (2,5-5%), alcool isopropilico (70%), perossido di idrogeno (20%), iodofori (50 ppm di iodio libero), glutaraldeide (2%).

Devono essere presenti delle procedure scritte per il comportamento da tenere in caso di incidente e, di questi ultimi, deve essere tenuta una registrazione scritta. Devono esistere indicazioni scritte riguardo ai disinfettanti da usare, con la diluizione raccomandata per ciascuno di essi.

Gli operatori esposti a rischio devono essere sottoposti a una sorveglianza sanitaria da parte del medico competente. Per i soggetti negativi alla intradermoreazione con PPD è raccomandata la vaccinazione con BCG. La profilassi con isoniazide è raccomandata qualora si rilevi la cuti-conversione in un soggetto non vaccinato. Controlli radiografici del torace, eseguiti con cadenza annuale o biennale, sono consigliati per il personale operante a tempo pieno nei laboratori di micobatteriologia.

Per quanto riguarda l'equipaggiamento, sono indispensabili la cappa di sicurezza biologica a flusso laminare tipo II, e la centrifuga dotata di contenitori di sicurezza. La cappa deve essere usata per tutte le operazioni che possono liberare aerosol.

La pressione negativa all'interno del laboratorio, pur non costituendo una misura di salvaguardia della salute di chi vi opera, è raccomandata: ha infatti lo scopo di evitare la diffusione dei micobatteri negli ambienti circostanti. Di fondamentale importanza è un sistema che garantisca un adeguato numero di ricambi d'aria ogni ora.

Esame microscopico

La caratteristica dei micobatteri di non cedere, nonostante il trattamento con alcol e acido, il colorante assunto in precedenza, è utilizzata a scopo diagnostico da oltre un secolo.

Svariate sono le tecniche messe a punto per evidenziarla; fra di esse quelle di più largo impiego sono la classica colorazione di Ziehl-Neelsen (ZN) e la metodica in fluorescenza.

Nella colorazione di ZN, al trattamento eseguito a caldo con fucsina fenicata fanno seguito la decolorazione con alcool etilico ed acido solforico e la colorazione di contrasto con blu di metilene. Il sistema in fluorescenza prevede invece l'impiego iniziale di un fluorocromo (solitamente l'auramina O) e, dopo la decolorazione, il trattamento finale con permanganato di potassio. Mentre con la colorazione di ZN i micobatteri appaiono rossi contro lo sfondo blu, nella fluorescenza i bacilli risultano fluorescenti in giallo-arancio contro lo sfondo scuro [►FOTO].

Le prerogative più importanti della colorazione di ZN sono costituite dall'ottima definizione della morfologia batterica e dalla conseguente facilità d'interpretazione; la fluorescenza si fa invece preferire per il marcato accorciamento dei tempi di lettura e per l'incremento di sensibilità.

L'esame microscopico, di facile esecuzione ed interpretazione, rappresenta ancora oggi il più importante test rapido disponibile in micobatteriologia.

La sua indubbia utilità a fini diagnostici trova forse nella scarsa sensibilità il limite principale. È stato infatti accertato che soltanto campioni contenenti una carica batterica non inferiore a 2.000-10.000 unità per mm^3 possono risultare positivi all'osservazione microscopica.

È per tale motivo che l'esame colturale, la cui sensibilità (10-100 batteri/ mm^3) è superiore di oltre due ordini di grandezza, deve sempre costituire il complemento dell'esame microscopico.

La colorazione di Gram non è applicabile ai micobatteri perché i coloranti non riescono a fissarsi alla parete cellulare e la cellula batterica assume l'aspetto riportato nella figura che rappresenta un preparato ottenuto da una coltura di *M. tuberculosis* su terreno di Lowenstein-Jensen [►FOTO].

Terreni di coltura

Le particolari esigenze nutrizionali dei micobatteri richiedono l'impiego di terreni diversi da quelli comunemente utilizzati in batteriologia; il confezionamento stesso dei terreni, solitamente distribuiti a becco di flauto in provettoni anziché in piastre

che si essicchierebbero con facilità, è conseguenza dell'esigenza d'incubazioni prolungate necessarie per la crescita di tali microrganismi.

Nei terreni classici la base è costituita da rosso d'uovo a cui vengono aggiunti sali minerali, fecola di patata e verde malachite; la solidificazione è ottenuta mediante riscaldamento a 80-90 °C per 40 minuti. Fra le varie formulazioni, assai simili fra loro, il Lowenstein-Jensen è quella di gran lunga più usata in tutto il mondo.

Piuttosto diffusi sono anche i terreni semisintetici a base di agar che si differenziano da quelli all'uovo per la mancanza della componente proteica e per la presenza di acido oleico, destrosio, catalasi e albumina.

Fra i terreni solidi di impiego più limitato occorre ricordare quelli selettivi che contengono una miscela di antibiotici e che possono essere utilizzati per la semina di materiali contenenti cariche elevate di germi contaminanti.

I terreni liquidi, il cui ruolo è stato a lungo sottovalutato in micobatteriologia, hanno raggiunto, negli ultimi anni, larghissima diffusione: la loro composizione ricalca sostanzialmente quella del Middlebrook 7H9 a cui viene aggiunta generalmente una miscela di antibiotici attivi su Gram positivi, Gram negativi e miceti, allo scopo di tenere sotto controllo l'eventuale flora associata (la più usata è la miscela PANTA contenente polymixina B, amfotericina B, acido nalidixico, trimetoprim ed azlocillina).

Nel sistema bifasico sono presenti terreni solidi a complemento del brodo di coltura.

Esame colturale

Con poche eccezioni, rappresentate dai materiali normalmente sterili (*liquor*, liquidi cavitari, sangue, ecc.), l'esecuzione della coltura per micobatteri richiede dei trattamenti preliminari del campione (decontaminazione ed eventuale fluidificazione) in assenza dei quali l'incidenza delle contaminazioni risulta troppo elevata.

La decontaminazione è una procedura che ha come obiettivo la distruzione della flora microbica associata presente nel campione biologico senza risultare lesiva nei confronti dei micobatteri. Nessuna delle metodiche disponibili possiede le caratteristiche suddette e ciascuna rappresenta un diverso compromesso fra le due opposte esigenze.

Una certa quota di contaminazioni (che non dovrebbero tuttavia interessare più del 5% delle colture) è quindi da considerarsi "fisiologica" tanto che una marcata riduzione di tale incidenza può essere considerata una spia dell'eccessiva lesività del metodo.

La tecnica considerata, ormai universalmente, di riferimento è quella che utilizza idrato di sodio al 2% abbinato a N-acetil-L-cisteina. Essa costituisce una variante della metodica originale di Petroff; ne differisce per la riduzione della concentrazione dell'idrato di sodio, compensata dall'aggiunta di un mucolitico, l'acetil-cisteina, e per la sostituzione dell'indiginosa neutralizzazione in presenza di un indicatore, con la semplice aggiunta di un tampone. Si tratta di un sistema di decontaminazione universale: applicabile ai materiali più disparati, utilizzabile con tutti i terreni di coltura (all'uovo, semisintetici, liquidi) e che permette l'impiego del campione decontaminato in tutte le moderne tecniche di amplificazione genomica. L'eventuale riscontro di una percentuale di contaminazioni troppo alta può essere controllato aumentando, fino ad un massimo del 3%, la concentrazione dell'idrato di sodio.

Per l'esecuzione della coltura l'abbinamento di un terreno solido ad un terreno liquido è attualmente considerata la scelta migliore, in grado di garantire il massimo di sensibilità e precocità di positivizzazione.

L'incubazione dei terreni di coltura si esegue normalmente a 37 °C, anche se temperature diverse possono essere necessarie per alcune specie particolari. La durata del periodo di incubazione non dovrebbe essere inferiore alle sei settimane, un prolungamento fino all'ottava settimana è tuttavia consigliabile.

La lettura delle colture su terreno solido, da effettuarsi settimanalmente, permette di rilevare tempestivamente inquinamenti e positivizzazioni. Sono riportati alcuni esempi di coltura di micobatteri tubercolari e non su terreno a becco di clarino di Lowenstein-Jensen [►►FOTO]. La natura delle colonie eventualmente sviluppatesi deve essere in ogni caso verificata microscopicamente con una colorazione per l'alcol-acido resistenza.

Il sistema radiometrico ha rappresentato per molti anni l'unico approccio automatico (o meglio, semiautomatico) alla coltura dei micobatteri. Esso si basa sulla misurazione della CO₂ liberata dal metabolismo dei microrganismi che si sviluppano nel terreno liquido. Grazie alla presenza, in tale terreno, di acido palmitico marcato con ¹⁴C, la CO₂ liberata risulta anch'essa radiomarcata ed è quindi facilmente rilevabile da un β-counter. La lettura viene effettuata settimanalmente fino al superamento, da parte del "growth index" (corrispondente al valore di radioattività letto dall'apparecchio), della soglia di positività.

Recentemente hanno fatto la loro comparsa sul mercato sistemi totalmente automatici per la coltura dei micobatteri in terreno liquido. Le tecnologie impiegate dalle varie ditte produttrici si basano sul rilevamento di variazioni di pressione (dovute al consumo di ossigeno), sul rilevamento della produzione di CO₂ (grazie al viraggio di colore di un apposito sensore) o sul rilevamento del consumo di ossigeno (che determina la comparsa di fluorescenza).

Identificazione

Ciascun micobatterio isolato da un materiale biologico dovrebbe essere identificato. Il significato clinico dell'isolamento dipende infatti da tutta una serie di fattori fra i quali ha un peso rilevante la specie del microrganismo. Tralasciando *M. leprae* e *M. ulcerans*, il cui reperto è da noi eccezionale, soltanto le specie appartenenti al *M. tuberculosis* complex sono da considerare certamente patogene; delle altre, quasi tutte presenti nell'ambiente, alcune possono occasionalmente colonizzare l'organismo umano e diventare patogene in presenza di fattori predisponenti.

Il sistema convenzionale di identificazione si basa classicamente su tre gruppi di prove: morfologico-colturali, biochimiche e d'inibizione selettiva.

Fra i test morfologico-colturali (Tabella 1) i principali sono quelli che permettono di rilevare la velocità di crescita, la presenza ed il tipo di pigmento, la capacità di sviluppo a varie temperature e la morfologia delle colonie. In base alla velocità di crescita è possibile classificare un microrganismo fra i micobatteri a crescita rapida o lenta a seconda che lo sviluppo di colonie visibili ad occhio nudo richieda meno o più di 7 giorni. Il rilevamento di tale caratteristica deve essere valutato in una subcoltura poiché nella coltura primaria anche le specie a crescita rapida si sviluppano più lentamente. Il rilevamento del pigmen-

to, oltre a permettere la distinzione fra specie pigmentate e non, consente il riconoscimento dei micobatteri fotocromogeni (pigmentati solo in seguito ad esposizione alla luce) da quelli scotocromogeni (la cui pigmentazione è indipendente da tale esposizione). Anche la morfologia delle colonie costituisce un valido aiuto a fini identificativi, specialmente se osservata con l'ausilio del microscopio, a basso ingrandimento (10×).

Fra i test biochimici i più importanti sono: la produzione di niacina, la riduzione dei nitrati, l'idrolisi del Tween e l'ureasi.

Le prove di inibizione selettiva consentono infine di valutare la capacità del ceppo in esame di svilupparsi in presenza di particolari sostanze (idrazide dell'acido tiofen-carbossilico, cloruro di sodio, tiacetazone, ecc.) aggiunte al mezzo di coltura.

I risultati delle prove di identificazione, confrontati con quelli reperibili in apposite tabelle, permettono di raggiungere una identificazione più o meno accurata. L'affidabilità dell'identificazione col sistema convenzionale, che si protrae in molti casi per tempi assai lunghi, anche due mesi, è stata fortemente ridimensionata negli ultimi anni, soprattutto a causa dell'esplosivo aumento delle specie.

Un approccio caratterizzato in questi ultimi anni da crescente successo è quello basato sull'impiego di DNA-probe. Si tratta di sistemi di cui sono ampiamente documentate in letteratura specificità e sensibilità. In commercio esistono vari kit; alcuni sono eseguibili direttamente sulla colonia isolata, altri richiedono un'amplificazione genica a monte. La tecnica usata è, in un caso, l'ibridizzazione in fase liquida e, nell'altro, l'ibridizzazione inversa su supporto solido; una modalità, quest'ultima, che permette l'identificazione contemporanea di più specie.

Fra i sistemi di screening deve essere segnalato il NAP-test che, mediante l'aggiunta del NAP (*p*-nitro-acetil-amino-idrossi-propiofenone) ad una coltura in terreno liquido radiometrico, permette di distinguere le specie del *M. tuberculosis* complex, che ne risultano inibite, dai micobatteri non tubercolari che crescono invece attivamente anche in presenza di tale sostanza.

Un altro importante sistema di identificazione è basato sull'analisi in *high performance liquid chromatography* (HPLC) degli acidi micolici presenti nella parete micobatterica. La separazione mediante HPLC di tali acidi grassi a catena lunga, la cui distribuzione nell'ambito delle specie micobatteriche è specie specifica, dà luogo a tracciati cromatografici che consentono, per semplice confronto con profili di riferimento, l'identificazione di specie.

L'identificazione certa delle specie più rare è infine raggiungibile soltanto mediante il sequenziamento di particolari regioni altamente conservate la più importante delle quali è il gene codificante per il rRNA 16S.

Saggio della sensibilità ai farmaci

La particolare struttura della parete dei micobatteri costituisce una barriera difficilmente superabile per la maggior parte degli antibiotici.

Soltanto un ristretto numero di farmaci risulta attivo sul *M. tuberculosis*; fra di essi i più importanti, detti "antitubercolari maggiori", comprendono: etambutolo, isoniazide, pirazinamide e rifampicina.

Generalmente il *M. tuberculosis* è sensibile a tali i farmaci, ma non sono infrequenti i casi di resistenza ad uno o più di essi. Tali resistenze si dicono primarie quando si manifestano in assenza di trattamento terapeutico e secondarie quando invece sono conseguenza della selezione effettuata da una terapia incongrua sui mutanti resistenti, sempre presenti, in proporzione compresa fra 10^{-5} e 10^{-7} a seconda dei farmaci, in una popolazione micobatterica.

Fra i vari sistemi proposti per determinare l'antibiotico-sensibilità del *M. tuberculosis*, quello utilizzato pressoché universalmente è il metodo delle proporzioni. Esso si basa sull'osservazione empirica che, se in una popolazione micobatterica la proporzione di microrganismi resistenti ad un determinato farmaco supera l'1%, l'uso in terapia di tale molecola porta rapidamente alla generalizzazione della resistenza medesima.

Nel metodo delle proporzioni, che può essere eseguito su terreni a base di uovo, su terreni sintetici, o in terreno liquido, si confrontano lo sviluppo avutosi in ciascuno dei terreni contenenti un singolo antibiotico con quello presente sul terreno di controllo. Siamo di fronte a resistenza ogniqualvolta la crescita ottenuta in presenza di un determinato farmaco è superiore ad 1/100 di quella comparsa sul terreno privo di antibiotici.

Il fenomeno delle resistenze del *M. tuberculosis*, che è stato lungamente sottovalutato, tanto che si riteneva superflua l'esecuzione dell'antibiogramma sui ceppi di primo isolamento, è letteralmente esploso negli ultimi anni. Le segnalazioni in letteratura di epidemie di micobatteri multiresistenti (si considerano tali i ceppi resistenti almeno a isoniazide e rifampicina) sono ormai numerosissime. Anche se in Italia la problematica non è per il momento allarmante, l'esecuzione dell'antibiogramma su tutti i nuovi isolati di *M. tuberculosis*, nonché ovviamente, su quelli che, anche se inizialmente sensibili dopo due mesi di terapia non sembrano rispondere, è da considerarsi doverosa.

Spostando l'attenzione dal *M. tuberculosis* ai micobatteri non tubercolari, la problematica della sensibilità ai farmaci si complica ulteriormente. La maggior parte di tali specie micobatteriche è infatti caratterizzata da notevoli resistenze naturali, il *M. avium* in particolare, è praticamente insensibile a tutti i farmaci attualmente disponibili. Le tecniche utilizzabili per l'antibiogramma del *M. tuberculosis* non sono applicabili a tali microrganismi e per il momento non esiste una metodica che possa essere considerata di riferimento. L'opinione più diffusa è comunque che soltanto la determinazione delle MIC in terreno liquido possa fornire dati attendibili. Per l'esecuzione di tali indagini si rende necessario il ricorso a centri di riferimento.

Amplificazione

L'oggetto di studio del microbiologo, rappresentato storicamente dal microrganismo, si è spostato, con la diffusione delle tecniche di biologia molecolare, ad alcune regioni specie-specifiche del suo genoma, delle quali è possibile, grazie alle procedure di amplificazione genica, produrre un elevato numero di copie a tutto vantaggio della sensibilità analitica. Per quanto riguarda il *M. tuberculosis* sono attualmente disponibili tre differenti sistemi commerciali basati sulla reazione polimerasica a catena (PCR), l'amplificazione transcriptasi mediata (TMA) e la amplificazione per spiazzamento (SDA).

Nella PCR, dopo un lavaggio iniziale del campione in esame ed un trattamento di estrazione e denaturazione del DNA eventualmente presente, viene aggiunta la “master mix” contenente, fra l’altro, i primer, la Taq-polimerasi e la miscela di nucleotidi. L’amplificazione si svolge in un thermal-cycler i cui cicli termici determinano in successione l’appaiamento dei primer, il loro allungamento e la denaturazione del filamento a doppia elica prodotto. La ripetizione di tali passaggi per una trentina di cicli determina in circa 2 ore la formazione di un miliardo di repliche del frammento presente nel DNA originale. Il DNA amplificato risulterà marcato, essendo i primer biotinilati, e può essere evidenziato colorimetricamente mediante la reazione avidina-biotina-perossidasi.

L’impiego, nella “master mix”, di nucleotidi contenenti uracile anziché timina determina l’incorporamento di tale base azotata nel prodotto dell’amplificazione. Risulta in tal modo possibile trattare con uracil-N-glicosilasi i campioni da amplificare per eliminare qualsiasi traccia di contaminazione dovuta a precedenti amplificazioni senza alterare il DNA nativo che, ovviamente, non contiene uracile.

Nella TMA, una volta lisati i micobatteri eventualmente presenti nel campione in esame, il materiale genomico liberato viene sottoposto all’azione combinata di transcriptasi inversa, RN-asi e DNA-polimerasi che, in presenza di nucleotidi e primer, inducono la sintesi del DNA a partire dal RNA batterico, la separazione dei due filamenti dell’ibrido DNA-RNA e la sintesi di ulteriori copie di RNA dal DNA neosintetizzato. Mancando la fase di denaturazione, tutta la reazione può svolgersi a temperatura costante. Il rilevamento dell’amplificato, al termine della reazione viene effettuato utilizzando probe marcati con molecole chemio-luminescenti.

Nella SDA il campione viene sottoposto a lisi e quindi ad amplificazione isotermica in presenza della miscela di reazione che comprende due diversi tipi di primer, specifici per sequenze contigue del bersaglio, i nucleotidi, la DNA-polimerasi e la sonda di rilevamento dell’amplificato. Il nucleotide a monte (bumper), allungandosi spiazza, e quindi libera sotto forma di catena singola, quello a valle che, essendosi a sua volta allungato, può fungere da stampo per un nuovo primer. Nelle doppie eliche formate da questi ultimi la presenza, all’estremità del primer, di un sito di restrizione, ne permette il clivaggio così che il frammento a monte spiazza quello a valle. La rilevazione dell’amplificato avviene in tempo reale; le sonde, ripiegate ad ansa, sono marcate con due fluorocromi uno dei quali (accettore), neutralizza l’altro (donatore). La distensione della sonda, dovuta all’allungamento dell’amplicone con cui è ibridizzata, determina l’allontanamento irreversibile, in conseguenza del taglio della sonda ad opera di un enzima di restrizione, dei due fluorocromi e la conseguente emissione di fluorescenza.

Qualsiasi sia il sistema impiegato, il risultato della reazione di amplificazione deve essere attentamente valutato. Solo nei casi in cui si ha concordanza fra le positività di esame microscopico e amplificazione non esistono dubbi sulla diagnosi di tubercolosi. In tutti gli altri casi il rischio di risultati errati dovuti alla scarsa sensibilità della procedura, alle contaminazioni o alla presenza di inibitori (nei casi in cui il sistema di amplificazione impiegato non ne preveda il monitoraggio) non deve essere trascurato.

A tale proposito il CDC consiglia la ripetizione del test di amplificazione in tutti i casi in cui risulti discordante rispetto all’esame microscopico.

Caratteristiche salienti delle più comuni specie di micobatteri (Tabella 1)

Specie	Velocità di crescita	Pigmento prodotto	Morfologia delle colonie	Crescita a 25 °C	Crescita a 45 °C	Test della Niacina	Test dei Nitrati
<i>M. avium/intracellulare</i>	lenta	non cromogeno	lisce	si	si	neg	neg
<i>M. chelonae</i>	rapida	non cromogeno	lisce	si	no	neg	neg
<i>M. flavescens</i>	lenta	scotocromogeno	rugose	si	no	neg	pos
<i>M. fortuitum</i>	rapida	non cromogeno	rugose	si	no	neg	pos
<i>M. goodii</i>	lenta	scotocromogeno	lisce	si	no	neg	neg
<i>M. kansasii</i>	lenta	fotocromogeno	rugose	si	no	neg	pos
<i>M. malmoeense</i>	lenta	non cromogeno	lisce	si	no	neg	neg
<i>M. marinum</i>	lenta	fotocromogeno	lisce	si	no	neg	neg
<i>M. nonchromogenicum</i>	lenta	non cromogeno	lisce	si	no	neg	neg
<i>M. phlei</i>	rapida	scotocromogeno	lisce	si	si	neg	pos
<i>M. scrofulaceum</i>	lenta	scotocromogeno	lisce	si	no	neg	neg
<i>M. simiae</i>	lenta	fotocromogeno	lisce	si	no	pos	neg
<i>M. smegmatis</i>	rapida	non cromogeno	lisce	no	si	neg	pos
<i>M. szulgai</i>	lenta	scotocromogeno	lisce	si	no	neg	pos
<i>M. terrae</i>	lenta	non cromogeno	rugose	si	no	neg	pos
<i>M. triviale</i>	lenta	non cromogeno	lisce	si	no	neg	neg
<i>M. tuberculosis</i> complex	lenta	non cromogeno	rugose	no	no	pos	pos
<i>M. xenopi</i>	lenta	scotocromogeno	lisce	no	si	neg	neg

Materiali e modalità di prelievo (Tabella 2)

MATERIALE	QUANTITÀ	NUMERODI CAMPIONI	CAMPIONI NON IDONEI
Aspirato gastrico	Almeno 5-10 mL prelevati al mattino, al risveglio del paziente	3, in giorni consecutivi	
Bronco-aspirato, BAL, brushing, aspirato trans-tracheale	almeno 5 mL		
Espettorato	5-10 ml raccolti al mattino	3, in giorni consecutivi	pool di campioni
Espettorato indotto	5-10 ml prelevati al mattino	3, in giorni consecutivi	
Feci	1-10 g		campioni con fissativo (contenitori per esame parassitologico)
Liquidi cavitari	almeno 10 mL		
Liquor	almeno 2 mL		
Midollo osseo	la massima possibile, in provetta con eparina	per l'esame microscopico (scarsamente significativo) inviare un vetrino strisciato	campione coagulato; prelievo con EDTA
Prelievi biotici	almeno 1 g di tessuto		campioni con fissativo (formalina, alcol, ecc.)
Pus	la massima possibile	in caso di prelievo con tampone (sconsigliato), almeno 2	
Sangue	10 mL, in provetta con eparina	3, a distanza di 30 min. l'uno dall'altro	campione coagulato; prelievo con EDTA
Sangue mestruale	alcuni mL, raccolti al 2°-3° giorno del flusso mestruale, in provetta con eparina		campione coagulato
Urine	almeno 50 mL della prima urina del mattino, raccolta direttamente o con la tecnica del mitto intermedio	3, in giorni consecutivi	campione delle 24 ore, campione da sacca

Capitolo XI

Mycoplasmataceae

Caratteristiche generali

I micoplasmi sono batteri molto particolari in quanto di dimensioni molto ridotte: sono i più piccoli microrganismi capaci di riprodursi su terreni acellulari: presentano una morfologia variabile (forme rotonde o filamentose anche in relazione al terreno di coltura) con una grandezza della cellula oscillante tra 0,2 e 0,3 μm (cellule sferiche) e tra 0,1 e 0,3 μm (cellule filamentose), le quali riescono quindi a passare anche i filtri per batteriologia con pori da 0,22 μm .

La loro cellula non possiede parete cellulare, ma solo una membrana citoplasmatica sprovvista di acido muramico: per tale motivo possono facilmente subire uno shock osmotico, non si colorano al Gram e sono resistenti agli antibiotici che agiscono sulla parete cellulare.

Crescono bene su terreni agarizzati ai quali debbono però essere aggiunti estratto di lievito (come precursore di acidi nucleici) e siero (come supplemento di steroli).

Si isolano da molti mammiferi ed uccelli ma anche da piante ed insetti.

La loro caratteristica è quella di aderire alle cellule delle membrane mucose dell'organismo colonizzandole [►FOTO] e dove possono essere presenti come commensali, ma possono produrre anche infezioni vere a livello dell'apparato respiratorio (*Mycoplasma pneumoniae*) ed uro-genitale (*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*).

Isolamento

La ricerca si esegue con tamponi faringei o coltura dell'espettorato per infezioni dell'apparato respiratorio, mentre per infezioni genito-urinarie si possono eseguire tamponi uretrali o endocervicali oppure coltivare il sedimento delle urine, mantenute in frigo per non più di 24 ore o congelate a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Poiché questi batteri sono molto sensibili all'essiccamento si deve eseguire le semina prima possibile dopo il prelievo o conservare il tampone in terreno di trasporto.

Morfologia delle colonie

La semina è fatta su terreni specifici, quali PPLO, SP4 ed A7: su quest'ultimo i micoplasmi crescono spesso in colonie dalla caratteristica forma "ad uovo" fritto (circa 200-300 μm), mentre gli ureaplasmi formano colonie più piccole, tondeggianti, brunastre, a forma di "riccio" (circa 15-40 μm).

L'incubazione è lunga per la ricerca del *Mycoplasma pneumoniae* (fino a 20 giorni in ambiente umido) ed avviene in aria ambiente, mentre per i micoplasmi uro-genitali sono sufficienti 48 ore tenendo le piastre preferibilmente in anaerobiosi o microaerofilia.

Le colonie si identificano al microscopio a piccolo ingrandimento ($\times 100$) andando a guardare direttamente la zona in cui è stata fatta la semina.

Talora possono crescere in agar colonie non di micoplasma ma che possono essere confuse con esse al solo esame visivo. Se si passa sulla superficie della piastra un tampone imbevuto di una soluzione di Dienes, questa colorerà in maniera permanente le colonie di micoplasma (centro blu e periferia con un blu più sfumato), mentre le altre tendono a decolorarsi rapidamente entro 30 minuti [►►FOTO].

Le colonie presentano la caratteristica di crescere approfondendosi nell'agar a differenza dei batteri che invece producono colonie sulla superficie.

Per trasferirle da una piastra all'altra è necessario incidere con un bisturi sterile l'agar in cui è avvenuta la crescita, trasferire il frammento in brodo, agitare bene in modo da mettere in sospensione i micoplasmi e seminare poi la nuova piastra.

Identificazione

L'identificazione dei micoplasmi urogenitali avviene impiegando varie metodiche: esame diretto al microscopio della morfologia delle colonie (solo per *Ureaplasma urealyticum*), semina in brodo all'urea ed all'arginina cui si applica lo schema seguente:

Arginina	+	(lenta)	
Urea	-		<i>Mycoplasma hominis</i>
Colonie ad		“uovo fritto”	
Arginina	-		
Urea	+	(rapida)	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
Colonie a		“riccio”	

L'identificazione del *Mycoplasma pneumoniae* si fa preparando una sospensione d'emazie di cavia al 5-8% in S.F. in agar all'1% e ricoprendo la piastra in cui si è avuta la crescita: si incuba per ulteriori 24-48 ore e si osserva se c'è stata produzione di emolisi beta intorno alle colonie, che è caratteristica di questo batterio. Dal punto di vista biochimico il *Mycoplasma pneumoniae* utilizza il glucosio ma non l'arginina e l'urea.

Poiché la coltura richiede comunque alcuni giorni per la crescita del batterio la diagnosi di laboratorio si fa preferibilmente, se non quasi esclusivamente, con la ricerca degli anticorpi specifici con varie metodiche.

Mentre l'isolamento del *Mycoplasma pneumoniae* da materiali biologici di norma sterili è sempre indice di un'infezione causata dal batterio, per riconoscere un ruolo di patogeni veri ai micoplasmi isolati da campioni uro-genitali è importante eseguire una conta batterica perché si ritiene che esista una possibile patogenicità se la carica batterica supera le 10.000 ufc/ml.

In commercio esistono vari kit che permettono di differenziare *Mycoplasma hominis* da *Ureaplasma urealyticum* e di valutarne in contemporanea la carica batterica e la sensibilità agli antibiotici comunemente impiegati in terapia.

È utile ricordare che si osserva spesso presenza, anche di cariche elevate, di *Mycoplasma hominis* in campioni prelevati da donne con vaginosi batterica.

Capitolo XII

Chlamydiaceae

Caratteristiche generali

A differenza dei micoplasmi, le clamidie non crescono in terreni agarizzati in quanto sono parassiti obbligati intracellulari e quindi necessitano di tecniche diverse per la loro ricerca diretta da materiale patologico.

Sono immobili, possiedono una parete cellulare simile a quella dei Gram negativi e come loro si colorano in rosso anche se la colorazione di Gram non è impiegata per il loro riconoscimento.

Le specie che interessano la patologia umana sono: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* (con serbatoi del germe solo nell'uomo) e *Chlamydia psittaci* (con serbatoio prevalentemente negli uccelli).

Chlamydia trachomatis è responsabile d'infezioni a trasmissione sessuale (uretriti, cerviciti, proctiti, epididimiti, endometriti, salpingiti, sindrome di Reiter), del linfogranuloma venereo e del tracoma. Spesso, dopo un rapporto sessuale non protetto, si ha contemporanea infezione da gonococco e da clamidia: questa situazione è particolarmente subdola perché la presenza in coltura del gonococco può non spingere ad indagare anche sulla presenza concomitante della clamidia, attribuendo la responsabilità dell'infezione al solo gonococco e trascurando la clamidia che invece, non risentendo della terapia specifica per il gonococco, può creare gravi problemi di sterilità, sia nella donna sia nell'uomo.

Il batterio può essere anche trasmesso dalla madre infetta al neonato durante il parto causandogli varie infezioni, di cui la più caratteristica è la congiuntivite (da inclusi), insieme alla polmonite.

Chlamydia pneumoniae causa una polmonite acquisita in comunità, ma anche bronchite e faringite con trasmissione ai contatti per via respiratoria, tramite aerosol di materiali infetti. L'infezione è diffusa nella popolazione perché si osservano tassi di sieroprevalenza intorno al 50% dei soggetti testati d'età superiore ai 30 anni. Sono ancora in corso studi tendenti a dimostrare una responsabilità diretta del batterio nella produzione di placche aterosclerotiche con conseguenti danni ai vasi arteriosi coronarici.

Chlamydia psittaci è responsabile di una zoonosi, nota come ornitosi, per trasmissione del batterio da uccelli infetti all'uomo (in particolare da pappagalli esotici): le feci infette dell'animale arrivano nell'ambiente da dove i batteri passano all'uomo per inalazione di polveri contaminate.

Isolamento

Il laboratorista deve fare attenzione a maneggiare campioni biologici o colture contenenti le clamidie perché si può facilmente infettare e quindi deve attenersi scrupolosamente alle procedure di biosicurezza.

La *Chlamydia trachomatis* si può ricercare seminando i campioni opportunamente trattati su colture cellulari della linea McCoy o HeLa (nei laboratori che fanno uso di questa metodica) oppure con l'impiego di altre tecniche, quali immunofluorescenza o metodi immunoenzimatici diretti, o con tecniche biomolecolari (PCR). I materiali esaminati sono di solito il secreto uretrale o endocervicale, le urine (ricordando di eseguire la prova sulla prima parte della minzione) e le secrezioni oculari.

Per le altre clamidie (*C. psittaci* e *C. pneumoniae*) si ricorre invece a tecniche per la ricerca degli anticorpi con immunofluorescenza indiretta (microimmunofluorescenza), Elisa, fissazione del complemento.

Capitolo XIII

Antibiogramma

Considerazioni generali

L'antibiogramma costituisce il momento più importante di tutta l'attività del laboratorio di batteriologia clinica in quanto permette di individuare gli antibiotici che mostrano, "in vitro", una maggiore attività inibente nei confronti del ceppo isolato nel processo infettivo in atto nel paziente.

In base dunque a questo referto il medico è in grado di scegliere l'antibiotico che ritiene più idoneo sulla base anche delle caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche della molecola che debbono essere ben conosciute per ottenere il successo della terapia.

Quindi il dato di laboratorio da solo non è sufficiente, ma ne costituisce un presupposto fondamentale in quanto indica quegli antibiotici che non avranno alcuna attività sui ceppi isolati (indicati come "resistenti" a quella molecola) e proporre quelli più efficaci (indicati come "sensibili").

In effetti, anche se non è sempre vero che certi antibiotici non attivi *in vitro* sono ugualmente inefficaci *in vivo*, è prassi ormai consolidata che il clinico scelga la terapia antibiotica tra i farmaci a cui il ceppo è risultato sensibile con il test eseguito in laboratorio. Ciò che il microbiologo è in grado di evidenziare sono le caratteristiche fenotipiche del batterio esaminato e quindi le modalità con cui risponde al saggio: ad esempio nei test di diffusione, le ampiezze dell'alone d'inibizione determinato dall'attività del farmaco, la presenza o meno di aloni interni alla zona d'inibizione o un'eventuale ricrescita batterica.

In base alla lettura degli aloni si ottengono i corrispondenti valori di sensibilità o resistenza comparandoli a quelli indicati dalle tabelle del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), un organismo indipendente non governativo riconosciuto come riferimento anche in Italia per l'interpretazione e la refertazione degli antibiogrammi.

È evidente che, per emettere referti affidabili, debbono essere seguite scrupolosamente le regole previste a secondo delle modalità scelte dal laboratorio per l'esecuzione del test che può essere fatto in manuale, in Italia di norma con il metodo di Kirby-Bauer, o con alcune apparecchiature automatiche del commercio.

In particolare deve essere eseguito costantemente un controllo di qualità interno (CQI), che permette di riconoscere come affidabili i risultati emessi, e partecipare ad un controllo di qualità esterno (VEQ), che ci conferma delle capacità analitiche delle prestazioni effettuate.

I test di diffusione da disco per l'antibiogramma sono limitati da alcuni problemi pratici, quali i tempi di coltura lunghi con il metodo manuale, la scarsa accuratezza

dovuta alla variabilità nella preparazione dell'inoculo, alle condizioni di coltura, alla inapplicabilità del test a certi batteri a crescita lenta e, non ultimo, all'incapacità del sistema di riconoscere correttamente alcuni importanti meccanismi di resistenza, ad esempio alla meticillina o ai glicopeptidi, non completamente risolti neppure dai più avanzati strumenti automatici.

Non è quindi facile scegliere le modalità operative con cui eseguire il proprio lavoro routinario proprio perché, ad oggi, non esiste un solo metodo o sistema che permetta sempre e comunque di dare risultati affidabili: ed è anche per questo motivo che non è possibile dare indicazioni che servano da linee guida assolute perché gli stessi organismi di riferimento modificano con frequenza le indicazioni già date in passato, alla luce delle nuove conoscenze ottenute.

Nei capitoli precedenti, dedicati ai singoli batteri, abbiamo dato alcune indicazioni pratiche sull'esecuzione dell'antibiogramma, ma in questo capitolo saranno approfonditi alcuni aspetti particolari di notevole interesse applicativo in quanto fondamentali per il corretto impiego della terapia. È quindi importante tenere sempre a mente che il Laboratorio di Microbiologia deve indirizzare la sua attività in senso clinico, per dare informazioni utili e talora indispensabili per il trattamento dei pazienti infetti, in modo particolare per quelli che presentano patologie più gravi.

L'esecuzione giornaliera degli antibiogrammi permette di raccogliere dati che, elaborati statisticamente, consentono al clinico di scegliere empiricamente una terapia antibiotica che ha un'alta probabilità di successo proprio perché basata sulla realtà microbiologica di quella specifica istituzione che, a volte, può differire anche di molto da quella di sedi anche vicine.

L'elaborazione statistico-epidemiologica dei risultati degli antibiogrammi permette anche di sorvegliare concretamente la situazione delle resistenze batteriche all'interno dei vari reparti ospedalieri, individuando con tempestività la presenza di ceppi con profili particolarmente pericolosi per cercare di prevenire la loro diffusione ad altri malati dello specifico reparto o di reparti confinanti.

Prima di sottoporre un isolato all'antibiogramma è necessario disporre di una coltura pura e quindi di colonie isolate perché solo su di esse si eseguirà il test; i campioni di sangue o di liquor cefalorachidiano che risultano infetti possono essere impiegati direttamente per fare l'antibiogramma, ricordando però che i risultati non debbono essere accettati in caso di evidenza di colture miste o se non si riesce ad ottenere una crescita semi-confluente su terreno solido.

È fondamentale conoscere il tipo di batterio da sottoporre all'esame osservandone le caratteristiche sui terreni impiegati per la coltura così da scegliere gli antibiotici giusti da impiegare nel saggio, se si utilizza un metodo di diffusione, o uno dei vari pannelli preconfezionati, se si usa un metodo automatico.

Le risposte che si ottengono dal test sono date in termini di: sensibilità (S), sensibilità intermedia (I) o resistenza (R) del batterio ad un determinato antibiotico con i seguenti significati:

a) sensibilità: il ceppo viene inibito impiegando in terapia il dosaggio d'antibiotico raccomandato per quel tipo d'infezione;

- b) sensibilità intermedia: il ceppo viene inibito solo con le massime dosi impiegabili in terapia o se l'infezione è localizzata in sede dove si ottiene una notevole concentrazione del farmaco, come ad esempio nell'apparato urinario;
- c) resistenza: il ceppo non risponde a quell'antibiotico alle concentrazioni ottenibili in terapia in quel particolare sito d'infezione o presenta specifici meccanismi di resistenza.

Metodi impiegati per i test di sensibilità

Esistono vari metodi per individuare la sensibilità dei batteri agli antibiotici e la scelta per l'applicazione nel proprio laboratorio dipende da numerosi fattori quali: la semplicità della tecnica, il costo, l'accuratezza richiesta, l'applicabilità nell'ambito dell'attività di quel laboratorio, la tipologia dei batteri isolati e la frequenza d'isolamento di certe specie rispetto ad altre.

In genere nei laboratori di piccole dimensioni o con scarso personale tecnico si preferisce optare per metodi manuali, quali il test di diffusione secondo Kirby-Bauer, che presentano il vantaggio di allestire pannelli in relazione al ceppo testato con costi non elevati e di verificare l'efficacia delle ultime molecole proposte dall'industria farmaceutica.

Nei laboratori di grosse dimensioni si preferisce affidarsi a strumentazioni automatiche che, in alcuni casi, permettono una risposta più veloce seppure a costi spesso più alti, e consentono un'elaborazione statistica dei dati in tempo reale grazie a speciali programmi di gestione delle informazioni registrate nel computer.

Da qualche anno è stato introdotto sul mercato un nuovo test chiamato E-test® che abbina alla tecnica della diffusione la possibilità d'individuare anche la MIC.

Metodo della diffusione da disco secondo Kirby-Bauer

È utilizzabile solo per batteri a crescita rapida e per alcuni patogeni "fastidious" mentre non è applicabile ai batteri a crescita lenta, ai micobatteri, agli anaerobi.

Come terreno base è impiegato di norma l'agar di Mueller-Hinton, cui deve essere aggiunto il 5% di sangue (in genere di pecora o di cavallo) per i germi più esigenti, sulla cui superficie è strisciato un tampone di cotone impregnato in una sospensione standardizzata del ceppo da esaminare, che costituisce l'inoculo batterico.

Per eseguire correttamente la procedura dobbiamo rispettare i seguenti punti fondamentali:

- a) Se il terreno non viene acquistato pronto dal commercio, preparare il terreno di Mueller-Hinton secondo le prescrizioni del produttore. Dopo l'autoclavatura lasciare raffreddare a 48-50 °C prima di aggiungere eventuali altri componenti nel terreno.
- b) Per ogni nuovo lotto di terreno è obbligatorio verificare il valore di pH a temperatura ambiente, che deve essere compreso tra 7,2 e 7,4. Se il pH è troppo basso certi farmaci perdono di potenza (aminoglicosidi e macrolidi), mentre altri (penicilline)

- possono mostrare un'eccessiva attività; il contrario può succedere se il pH è troppo alto. Il pH deve essere verificato anche dopo l'aggiunta del sangue.
- c) Verificare il pH con il pHmetro.
 - d) È necessario verificare ogni nuovo lotto per la corretta quantità di timidina o timida perché un eccesso può interferire con l'attività delle sulfonamidi e del trimetoprim, causando zone di inibizione più piccole, o meno chiare o del tutto assenti. Per valutare la bontà del terreno si deve impiegare il ceppo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186 con i quali si deve osservare una zona d'inibizione di 20 mm di diametro o più grande.
 - e) Una variazione nella concentrazione dei cationi bivalenti (principalmente magnesio e calcio) può rendere inaffidabile il test quando si saggiavano aminoglicosidi e tetracicline con ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*: un'eccessiva quantità di cationi ridurrà la grandezza degli aloni mentre una quantità inferiore li può rendere ingiustificatamente più grandi. Per valutare la bontà del terreno usare il ceppo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Alcuni ceppi a crescita difficile ("fastidious") o altri germi particolari debbono essere saggiati sui terreni previsti dall'NCCLS nella tabella relativa allo stipite considerato.

L'inoculo deve avere un valore di torbidità pari allo standard 0,5 McFarland che si può acquistare già pronto in commercio o preparare come segue: 0,5 ml di una soluzione 0,048 mol/L di BaCl_2 (1,175% v/v di $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sono aggiunti a 99,5 ml di una soluzione 0,18 mol/L (0,36 N) di H_2SO_4 (1% v/v), agitando continuamente per mantenere in sospensione.

La corretta densità dello standard deve essere verificata con uno spettrofotometro con una cuvetta in vetro da 1 cm di percorso ottico e lettura d'assorbanza a 625 nm che deve essere compresa tra 0,08 e 0,10.

La soluzione di solfato di bario deve essere mantenuta ben chiusa a temperatura ambiente ed al buio, possibilmente in tubi chiusi con tappo a vite dello stesso tipo di quelli impiegati per la crescita o la diluizione dell'inoculo batterico. Lo standard deve essere mescolato vigorosamente sul vortex e visionato per una torbidità uniforme, ma in presenza d'eventuali grumi deve essere scartato. Comunque ogni mese lo standard dovrebbe essere sostituito o verificato per la torbidità.

Per la preparazione dell'inoculo batterico si toccano con l'ansa da tre a cinque colonie con identica morfologia e si trasferiscono in una provetta contenente 4 o 5 ml di Mueller-Hinton broth incubando in termostato a 35 °C fino ad ottenere una torbidità pari allo 0,5 MacFarland (2-6 ore), corrispondente ad una concentrazione di $1-2 \times 10^8$ CFU/ml. Se in eccesso o difetto si corregge per diluizione con brodo sterile o aggiungendo altre colonie e verificando con lo spettrofotometro o visivamente leggendo la torbidità su uno sfondo chiaro con linee nere di contrasto.

Per saggiare invece organismi fastidiosi come l'*H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, streptococchi e per la verifica della meticillina resistenza degli stafilococchi è necessario ricorrere al metodo della sospensione batterica direttamente dalle colonie su piastra: ne selezioniamo alcune da una piastra di terreno non selettivo incubata per almeno 18-24 ore e si stemperano in brodo o fisiologica sterili per ottenere una torbidità pari allo 0,5 McFarland.

Si possono usare piastre pronte del commercio o quelle preparate in casa che comunque debbono essere tolte dal frigorifero almeno 30' prima del test e, se bagnate, debbono essere fatte asciugare in termostato.

Entro 15' dalla preparazione dell'inoculo immergere nella sospensione un tampone di cotone, spremere sulla parete della provetta l'eccesso di liquido e passarlo accuratamente su tutta la superficie della piastra, compreso il bordo. Lasciare la piastra aperta rovesciata sul coperchio per 3-5' e per un massimo di 15' per eliminare ogni eccesso d'umidità prima di applicarvi i dischi d'antibiotici.

I dischi degli antibiotici sono costituiti da piccoli tondi di carta bibula su cui è stato fatto assorbire l'antibiotico ad una definita concentrazione e debbono essere conservati in congelatore a -20 °C nell'involucro originale. I dischi impiegati giornalmente devono essere invece conservati in frigorifero all'interno di un apposito contenitore con un essiccante.

Prima dell'uso togliere il contenitore dal frigorifero o dal congelatore e lasciarlo chiuso a temperatura ambiente per almeno 1 o 2 ore per ridurre al minimo la quantità di condensa che può andare in contatto con i dischi.

I dischi scaduti debbono essere scartati e non usati. Se i dischi formano delle zone d'inibizione non corrette con gli organismi di controllo raccomandati si deve fare un controllo dell'intera procedura per rendersi conto di cosa non ha funzionato.

Prelevare ogni dischetto con pinze sterili o sterilizzate alla fiamma e raffreddate adeguatamente e porli con attenzione sul terreno pressandoli leggermente al centro per farli aderire all'agar e mantenendoli ad una distanza l'uno dall'altro di non meno di 24 mm da centro a centro. Usando piastre da 90 mm non inserire più di 6 antibiotici e se da 150 mm non più di 12, ma rispettivamente non più di 4 e non più di 9 per emofili, gonococco e streptococchi per impedire la confluenza degli aloni d'inibizione.

Poiché la diffusione di molti antibiotici è immediata non appena il disco è a contatto con il terreno, non riposizionare un disco già applicato sull'agar e se il disco è già stato posizionato in un posto sbagliato toglierlo e metterne un altro nel posto giusto.

Le piastre devono essere poste in posizione invertita in termostato a 35 °C entro 15' dall'applicazione dei dischi, in atmosfera normale; devono essere poste in CO₂ quelle per *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* e streptococchi alfa emolitici, compreso lo *Streptococcus pneumoniae*.

Incubare le piastre a 35 °C per 16-18 ore per tutti i batteri tranne che per *Neisseria gonorrhoeae* e streptococchi alfa emolitici che devono restare in termostato per 20-24 ore, mentre gli stafilococchi debbono restare per 24 ore piene per verificare l'eventuale resistenza alla meticillina.

La lettura degli aloni si esegue controllando la corretta crescita della patina batterica che deve presentarsi regolarmente diffusa [►FOTO]. Leggere in buone condizioni di luce il diametro dell'alone d'inibizione della crescita usando un calibro o un doppio decimetro.

Nei terreni al sangue leggere le zone d'inibizione dalla superficie d'appoggio dei dischi osservandola con una luce riflessa e senza il coperchio della piastra, considerando l'alone più esterno e non quello dell'inibizione dell'emolisi [►FOTO].

Per gli stafilococchi e gli streptococchi osservare le piastre dopo 24 ore a luce trasmessa tenendo la piastra alzata verso la sorgente luminosa per scorgere eventuali piccole colonie all'interno degli aloni dei dischi di oxacillina e vancomicina per i quali ogni identificata crescita è indicativa di resistenza del ceppo.

Il margine della zona deve essere considerato fino al punto in cui non si osserva una crescita evidente ad occhio nudo: se si notano colonie isolate all'interno di una zona di completa inibizione della crescita occorre identificare il ceppo e, se necessario, ripetere il test in quanto ci può essere stata una contaminazione con un altro batterio, anche in fase di preparazione dell'inoculo.

Alcuni ceppi di *Proteus* possono presentare, con certi antibiotici, una sottile crescita a velo vicino al bordo della netta inibizione di crescita che, in questo caso, non deve essere considerata.

Leggere gli aloni e fare riferimento per l'interpretazione degli stessi alla Tabella 2 (M2-A6) del NCCLS per i vari batteri ad eccezione dell'emofilo (Tabella 2A), del gonococco (Tabella 2B) e degli streptococchi alfa emolitici (Tabella 2C).

La resistenza alla vancomicina degli enterococchi deve essere verificata dopo un'incubazione delle piastre di almeno 24 ore, esaminando attentamente l'alone d'inibizione con una luce trasmessa per evidenziare anche piccole colonie o un sottile film di crescita all'interno della zona, ma è comunque meglio confermare con la determinazione della MIC in agar. Sempre per gli enterococchi si deve verificare la resistenza agli aminoglicosidi impiegando dischi ad alto contenuto di gentamicina (120 µg) e/o di streptomina (300 µg): zone di inibizione completa indicano resistenza, aloni >10 mm indicano assenza di alti livelli di resistenza e zone comprese tra 7 e 9 necessitano della determinazione di una MIC. Questa prova è importante perché l'individuazione di un ceppo resistente ad alte concentrazioni di aminoglicoside determina, di fatto, l'impossibilità d'impiegarlo in terapia combinata con un antibiotico β-lattamico.

Ceppi di *Klebsiella* spp. ed *Escherichia coli* con ridotti aloni d'inibizione con ceftazidime, aztreonam, cefotaxime e ceftriaxone sono sospetti di possedere una β-lattamasi a spettro allargato (ESBL), ma poiché alcuni ceppi possono evidenziare un debole livello di resistenza è necessario impiegare un test apposito per confermare la presenza di questi enzimi (E-test® o prova dei dischi multipli).

La ricerca delle β-lattamasi si fa con un disco di nitrocefina in particolare per *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis* ed è l'unico test affidabile per individuare i ceppi di enterococco produttori di β-lattamasi: il test positivo predice la resistenza a penicillina, ampicillina ed amoxicillina per *Haemophilus*, *N. gonorrhoeae* e *Moraxella catarrhalis*, così come predice resistenza a tutte le penicilline per stafilococchi ed enterococchi.

Un test negativo non esclude ovviamente una resistenza dovuta ad altri meccanismi.

Non impiegare il test per gli enterobatteri, *Pseudomonas* spp. ed altri Gram negativi aerobi.

Stafilococchi

La maggior parte degli stafilococchi isolati in laboratorio (~ 95%) è ormai resistente alla penicillina per iperproduzione di β-lattamasi; pertanto qualora si isoli un ceppo

che sembra essere sensibile è opportuno controllarne la reale sensibilità eseguendo il test per la ricerca della produzione della β -lattamasi con un dischetto di “Nitrocefina®” oppure con un disco di penicillina da 10 U, che deve dare un alone d’inibizione della crescita ≥ 28 mm.

I ceppi resistenti alla penicillina debbono essere considerati resistenti anche a: ampicillina, amoxicillina, azlocillina, carbenicillina, mezlocillina, ticarcillina, piperacillina, mentre restano sensibili alle penicilline protette con inibitori delle β -lattamasi, cefemi e carbapenemi.

Attualmente sono numerosi i ceppi resistenti anche alla meticillina, specie in ambito ospedaliero ed in particolare in reparti di rianimazione, dove si possono osservare percentuali di resistenza superiori al 60-70% degli stipti isolati.

Questa resistenza è dovuta all’acquisizione di un gene chiamato *mecA* che determina la produzione di una PBP variata, indicata come PBP2a o PBP2’, che ha una bassissima affinità ai farmaci β -lattamici e quindi impedisce il legame con l’antibiotico.

Una buona parte dei ceppi isolati presenta una resistenza eterogenea alla meticillina e questa caratteristica determina grossi problemi pratici perché spesso risultano sensibili *in vitro* molti antibiotici β -lattamici (cefalosporine con e senza inibitori delle β -lattamasi), che invece debbono essere considerate inattive in quanto inefficaci *in vivo*.

Ciò è dovuto al fatto che, durante la crescita batterica nel test, oltre il 99% delle cellule presentano un basso livello di resistenza perché il ceppo cresce con difficoltà nel mezzo di coltura e risultano pertanto inibite e dall’antibiotico, determinando l’espressione fenotipica della sensibilità: però almeno una cellula su un milione ha una MIC > 50 mg/L causando la non risposta del farmaco *in vivo*.

In tal caso tutti gli antibiotici β -lattamici debbono essere considerati inattivi e non impiegati in terapia: il laboratorio di microbiologia deve dunque accertarsi della correttezza dei referti emessi ma mentre i sistemi automatici più recenti possiedono sistemi esperti con possibilità di una corretta interpretazione del risultato, nel caso d’impiego di sistemi manuali di diffusione, come il Kirby-Bauer, deve provvedere ogni volta l’operatore sanitario che legge l’antibiogramma.

Per verificare la resistenza alla meticillina è necessario impiegare uno screening con agar Mueller-Hinton addizionato di oxacillina (6 mg/L) e NaCl al 4%: il test è positivo se si osserva la crescita anche di una sola colonia, dopo incubazione a 35 °C per 24 ore complete.

Recentemente sono stati segnalati ceppi di *Staphylococcus aureus* con resistenza intermedia ai glicopeptidi (GISA o VISA: MIC vancomicina 8 mg/L) o completa alla vancomicina (VRSA: MIC vancomicina ≥ 32), fortunatamente ancora rari, che non sono evidenziabili con il normale test di diffusione in agar e necessitano di test specifici per il loro riconoscimento. Il CDC consiglia l’uso di uno screening con agar BHI con incorporata vancomicina alla concentrazione di 6 mg/L.

Se il ceppo non cresce su questo terreno e presenta un alone > 14 mm quando saggiato con vancomicina si può refertare come vancomicina sensibile; se invece cresce su questo terreno e se ha un alone < 14 mm con vancomicina, può trattarsi di un ceppo VISA/VRSA, che deve essere comunque confermato per la purezza e per l’effettiva

resistenza alla vancomicina con test in MIC o, meglio ancora, inviandolo in un centro di riferimento.

Poiché è dimostrato che non tutti i sistemi automatici attualmente in uso sono in grado di evidenziare la resistenza alla vancomicina è opportuno che ogni laboratorio che isola stafilococchi da infezioni di una certa gravità faccia in parallelo anche la prova con lo screen agar per assicurarsi della validità della risposta.

Lo *Staphylococcus aureus* ma anche gli stafilococchi coagulasi negativi possono avere resistenza costitutiva o inducibile alla clindamicina, antibiotico di una certa importanza nella terapia delle infezioni causate da questi batteri.

La resistenza alla clindamicina può essere rilevata ponendo un disco di clindamicina (2 mg) a 15-26 mm di distanza da un disco di eritromicina (15 mg): i ceppi che non mostrano modificazioni dell'alone devono essere refertati come sensibili. Quelli che invece hanno una resistenza di tipo inducibile sono resistenti all'eritromicina (assenza di crescita intorno al disco) e presentano un alone a D (non completo dalla parte del disco di eritromicina) intorno al disco di clindamicina [►►FOTO].

In questo caso tutti i macrolidi a 14, 15 e 16 atomi di Carbonio e la clindamicina devono essere considerati come non attivi e come tali segnalati al clinico.

Nel caso in cui l'eritromicina sia resistente ed il D-test negativo, i macrolidi a 14 e 15 atomi di C devono essere considerati non attivi, mentre lo sono quelli a 16 atomi di C ed ovviamente anche la clindamicina.

Streptococcus pyogenes

Come è noto per questo batterio non è stata ancora segnalata la resistenza alla penicillina mentre varia molto, da paese a paese, la resistenza ai macrolidi con punte che superano anche il 50% dei ceppi testati.

La resistenza ai macrolidi può essere di vario tipo ed è dovuta ad una mutazione sul sito d'azione dell'antibiotico (i ribosomi) con presenza di tre diversi fenotipi di resistenza rivolti verso i macrolidi, lincosamidi e streptogramina B (resistenza MLS_B):

- A) Costitutivo: determina resistenza a tutti i macrolidi ed è evidenziato dalla contemporanea resistenza ad eritromicina e clindamicina con il test del doppio disco.
- B) Inducibile: determina resistenza diretta a tutti i macrolidi a 14 e 15 atomi di C ma, dopo induzione, anche a quelli a 16 atomi di C, a clindamicina e streptogramina B. Si evidenzia con la resistenza dell'eritromicina e sensibilità particolare della clindamicina (alone a D della crescita batterica intorno al disco della clindamicina).

Coloro che impiegano il test della diffusione di Kirby-Bauer debbono mettere vicini i dischi di eritromicina e clindamicina altrimenti possono dare risultati errati di falsa sensibilità della clindamicina in quanto risulterebbe sensibile se posto lontano da quello dell'eritromicina.

- C) A pompa d'efflusso: presenta un fenotipo di resistenza M non inducibile che determina resistenza a basso livello all'eritromicina ciò comporta una resistenza ai macrolidi a 14 e 15 atomi di C, ma sensibilità a quelli a 16, alle lincosamidi ed alla streptogramina B.

Enterococchi

Esistono alcuni problemi pratici legati alla determinazione della sensibilità degli enterococchi ai glicopeptidi a causa della presenza di popolazioni con differenti pattern di sensibilità e dovuti al fatto che solo 1 mm d'alone di diffusione può far spostare il ceppo da sensibile a resistente. In effetti quel mm rappresenta ben due diluizioni di MIC in quanto il valore dell'alone d'inibizione < 17 mm corrisponde a resistenza del ceppo e ad una MIC > 16 $\mu\text{g/ml}$, mentre il valore ≥ 17 mm corrisponde a sensibilità e ad una MIC ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$.

Purtroppo anche i sistemi automatici non sono spesso in grado di dare risposte migliori con la lettura delle MIC e quindi bisogna sempre fare molta attenzione quando si esegue l'antibiogramma su questi batteri.

Bisogna ricordare che *E. faecalis* e *E. faecium* presentano una resistenza intrinseca a varie classi di antibiotici quali cefalosporine, aminoglicosidi (a basso livello) ed a clindamicina e cotrimossazolo che pertanto non devono essere testati nel saggio. Dimostrano inoltre una resistenza acquisita agli aminoglicosidi (ad alto livello), ai β -lattamici per produzione di una β -lattamasi ed ai glicopeptidi.

Streptococchi viridanti

Per penicillina, ampicillina ed oxacillina l'NCCLS non fornisce i valori di *break-point* per il metodo della diffusione e pertanto l'antibiogramma deve essere eseguito con la metodica della MIC, la cui conoscenza è determinante per la scelta della terapia e della sua durata.

Bisogna anche ricordare che esistono streptococchi tolleranti alla penicillina con valori di MBC 32 volte superiori alla MIC.

Batteri anaerobi

A differenza di quanto accade con i germi aerobi l'antibiogramma per i germi anaerobi non è consigliato come test di routine ad eccezione dei seguenti casi:

- a) batteri isolati da soggetti con endocardite
- b) batteri isolati da emocolture nelle batteriemie ricorrenti
- c) in soggetti con artriti settiche ed osteomieliti
- d) fallimento dell'usuale trattamento terapeutico

Il motivo è dato dal fatto che spesso le infezioni da anaerobi sono spesso miste riconoscendo la presenza ed una responsabilità anche di batteri aerobi di cui comunque deve essere tenuto conto per la terapia, o che, proprio a causa delle caratteristiche di queste infezioni, è difficile raggiungere concentrazioni attive nel sito d'infezione perché può esserci necrosi dei tessuti o formazione di ascessi.

Risulta comunque utile eseguire l'antibiogramma in caso di isolamento del ceppo in coltura pura o in corso d'infezioni gravi o prolungate.

Le specie con profili di sensibilità variabile o che comunque mostrano spesso resistenze singole o multiple sono quasi sempre limitate al *Bacteroides fragilis*, al genere *Clostridium* (tranne il *C. perfringens*) e ad alcuni Gram negativi.

Sono raccomandate poche molecole antibatteriche da saggiare abitualmente, quali clindamicina, penicillina, alcune cefalosporine con azione anti anaerobi (cefalexina, cefotetan), mentre solo periodicamente dovrebbero essere verificati i seguenti antibiotici: cloramfenicolo, imipenem, metronidazolo e penicilline protette con inibitore delle β -lattamasi.

Per gli anaerobi non è validato il metodo di diffusione e bisogna forzatamente ricorrere al test di agar diluizione (improponibile per la routine) o ai metodi con l'impiego delle MIC che sono gli unici riconosciuti per confermare la resistenza del ceppo.

In alternativa può essere impiegato l'E-test® secondo le indicazioni del produttore.

Batteri produttori di β -lattamasi

Molti batteri, ed in particolare gli enterobatteri, sono in grado di produrre enzimi idrolizzanti l'anello β -lattamico di penicilline e cefalosporine di prima generazione. Questa proprietà deve essere accuratamente individuata per evitare di somministrare in terapia dei farmaci antibatterici che risulterebbero sicuramente inefficaci.

Per individuare l'attività β -lattamasica si può eseguire il test diretto impiegando un disco di nitrocefina (cefalosporina cromogenica) che predice la resistenza alla penicillina per *Bacteroides* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus* sp., anche se per questi ultimi non è giustificato un saggio routinario.

Bisogna anche ricordare che un test negativo non esclude altri meccanismi di resistenza che debbono comunque essere verificati ed inoltre questa prova non deve essere usata per testare gli enterobatteri in quanto non predice la sensibilità agli altri β -lattamici impiegabili in terapia.

Negli ultimi anni sono comparsi in tutto il mondo, con sempre maggiore frequenza, ceppi con resistenze rivolte a molte delle β -lattamine introdotte in terapia, in particolare cefalosporine di terza generazione e monobactami, per i quali è stato coniato il termine di produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ES β L). Questi enzimi sono prodotti soprattutto da ceppi di *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, sono mediati da plasmidi e presentano un ampio range di substrati e molti di essi sono prodotti per mutazione del genoma che codifica gli enzimi di tipo TEM ed SHV, ma vi sono anche enzimi di diversa derivazione come CTX-M e PER 1 o 2. Inoltre questi batteri mostrano spesso una resistenza acquisita anche ad altre classi di antibiotici, quali fluorochinoloni ed aminoglicosidi, limitando le opzioni terapeutiche solamente ai carbapenemici o alle combinazioni di un β -lattamico con un inibitore delle β -lattamasi.

Per il loro riconoscimento in laboratorio, l'NCCLS propone una tabella (Tabella 2A Enterobacteriaceae, M2-Disk Diffusion), nella quale sono riportati i valori degli aloni d'inibizione delle varie β -lattamine al di sotto dei quali si può sospettare la presenza di un ceppo produttore di ES β L; la conferma si ha se si nota un incremento

dell'alone d'inibizione maggiore di 5 mm impiegando un dischetto in cui la singola molecola è combinata con l'acido clavulanico.

Un metodo di riferimento è considerato il test di sinergia del doppio disco (DD) [►FOTO]: si esegue su una piastra di agar Mueller-Hinton su cui è stata strisciata la coltura del ceppo in esame utilizzando dischi di aztreonam, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, messi in croce ad una distanza di 25 mm (centro-centro) mentre nella centro della croce è inserito un disco di amoxicillina/acido clavulanico.

I batteri produttori di ESβL mostrano aloni allungati o di forma particolare (“a tappo di spumante”) tra il disco di amoxicillina/acido clavulanico ed uno o più degli altri antibiotici del saggio. Ciò indica che il ceppo diventa sensibile all'antibiotico solo in presenza dell'inibitore (acido clavulanico) che appunto agisce in sinergia con esso permettendone l'espressione fenotipica e quindi il riconoscimento.

La distanza tra i dischi è critica e quindi si deve fare attenzione nel posizionarli sull'agar; bisogna anche ricordare che è necessario spostare a 30 mm la distanza tra i dischetti quando si saggia *Klebsiella pneumoniae* o il *Proteus mirabilis*, perché producono aloni più grandi e quindi non si vedrebbe la differenza nella forma degli stessi.

Un test negativo non esclude la presenza di altri meccanismi di resistenza che sono posseduti da batteri iperproduttori di cefalosporinasi (AmpC): in questo caso si osservano aloni di inibizione sempre molto piccoli o assenti, non influenzati dall'acido clavulanico.

In alternativa al test del doppio disco può essere impiegato l'E-test® con apposite strisce per la rivelazione dei ceppi ESβL produttori.

Da pochi anni si sono osservati stipiti che risultano resistenti anche ai carbapenemici attraverso la produzione di metallo β-lattamasi (MBLs) acquisite da vari batteri Gram negativi enterici e non fermentanti ed anaerobi, in grado d'inattivare anche questi potenti antibiotici, rendendo estremamente problematica, se non talora impossibile, una terapia antibiotica in quanto spesso presentano una concomitante resistenza anche agli aminoglicosidi.

Questi enzimi sono di due tipi, IMP e VIM, ognuno dei quali comprende varianti alleliche multiple: in particolare in *Pseudomonas aeruginosa* sono stati descritti tre diversi tipi di VIM (1, 2, 3). Le apparecchiature automatiche non sono in grado d'evidenziare questi ceppi e neppure il classico metodo di Kirby-Bauer. Bisogna ricorrere allora a metodi alternativi ed è stato proposto l'E-test® con l'impiego di strisce con gradiente continuo d'imipenem e con livelli costanti di EDTA che inibisce queste MBLs e ne permette il riconoscimento fenotipico.

Test di sensibilità eseguiti con l'impiego di strumentazione automatica

Nei laboratori di Microbiologia che svolgono grossi moli di lavoro il metodo di Kirby-Bauer è difficilmente applicabile a meno che non si abbia a disposizione un sufficiente numero di tecnici. Si preferisce quindi ricorrere a strumentazioni automatiche che hanno il pregio di processare numerosi campioni, di dare risposte anche in tempi rapidi, talora inferiori alla 10 ore, di fornire risposte quantitative delle MIC e di ottenere una maggiore riproducibilità dei risultati, sia intra sia interlaboratori.

Inoltre, grazie ai programmi informatici predisposti, permettono un controllo sul dato con l'adozione di un sistema esperto che, utilizzando una serie di regole precodificate, impedisce l'uscita di risposte errate o maschera antibiotici che non vogliamo far pervenire al medico per vari motivi (costi, seconda scelta, ecc.).

Un altro grande vantaggio di questi strumenti è dato dalla possibilità di fare elaborazioni statistiche ed epidemiologiche su tutti gli esami batteriologici eseguiti in laboratorio, permettendo di conoscere con esattezza la tipologia della flora batterica isolata, sia per reparto sia per materiali, di valutarne le variazioni nel tempo delle sensibilità agli antibiotici e quindi di avere un quadro ben preciso della propria realtà locale. Tali nozioni sono assolutamente necessarie per il clinico il quale se ne può utilmente giovare per intraprendere una terapia empirica con buone probabilità di successo, prima ancora di ricevere la risposta dell'antibiogramma.

I sistemi automatizzati presentano tuttavia anche alcuni svantaggi, quali costo di gestione elevato, ingombri e consumi notevoli, difficoltà se non impossibilità a verificare la validità di nuove molecole antibiotiche fino alla loro introduzione su un nuovo pannello.

Inoltre non sono utilizzabili per tutte le specie incontrabili in laboratorio, in particolare alcuni batteri "fastidious" e certi Gram negativi non fermentanti, e non riescono sempre ad evidenziare alcuni tipi di resistenze, specie per quegli apparecchi che impiegano metodiche rapide (da 3 a 6 ore) perché un periodo di tempo così ridotto può non essere adeguato per evidenziare alcuni meccanismi di resistenza. Esiste anche la possibilità che siano evidenziate false resistenze ad alcuni antibiotici, in particolare aztreonam ed imipenem, in particolare per le specie di *Proteus*.

Infine, anche se questi sistemi hanno ottenuto l'autorizzazione all'impiego diagnostico da parte dell'FDA, non esistono standard di riferimento da parte dell'NCCLS.

Pertanto, in attesa di metodi più avanzati ed innovativi che identificano la resistenza agli antibiotici a livello genetico, l'utilizzatore deve conoscere bene tutti i limiti e le problematiche dello strumento acquisito, tenendo comunque in mente che, specie per le resistenze batteriche emergenti, non può essere utilizzato un solo metodo convenzionale o commerciale e che possono essere necessari altri test di screening e/o di conferma.

Capitolo XIV

Controlli di qualità

I controlli di qualità nel laboratorio di microbiologia clinica

I controlli di qualità sono uno strumento indispensabile per assicurarsi della qualità delle prestazioni eseguite dal laboratorio ma debbono essere inseriti in un programma più vasto di qualità globale del laboratorio, all'interno quindi di un sistema qualità che preveda un programma operativo completo in grado di assicurare che l'intero percorso del flusso di lavoro di ogni singolo test sia in accordo con dei criteri prestabiliti.

Un sistema di Assicurazione di Qualità (QA) deve prefiggersi alcuni scopi tra cui i più importanti sono: a) migliorare la qualità dell'assistenza sanitaria; b) produrre risultati affidabili e riproducibili; c) permettere la comparazione inter-laboratorio dei test eseguiti; d) fondare la credibilità del laboratorio per gli utenti del servizio, interni ed esterni; e) motivare lo staff tecnico per ulteriori miglioramenti; f) prevenire complicazioni legali derivanti dall'emissione di referti di scarsa qualità.

Per raggiungere questi obiettivi è necessario mettere in atto alcune procedure di QA: standardizzare la tecnica d'esecuzione dell'esame, partecipare ad un programma di valutazione esterna di qualità (VEQ), impiegare con costanza gli stipiti di riferimento, riconoscere eventuali risultati atipici che possono presentarsi nella routine giornaliera di lavoro e, soprattutto, individuare le probabili fonti d'errore nel metodo.

Esistono due tipi di controlli che presentano modalità e fini diversi: il controllo di qualità interno o intra-laboratorio (CQI) ed il controllo di qualità esterno, meglio indicato come valutazione esterna di qualità (VEQ) inter-laboratori. Entrambi debbono essere eseguiti costantemente ed insieme dal laboratorio in quanto non sono intercambiabili.

Il CQI prevede una serie d'operazioni adottate dallo staff tecnico per controllare che tutte le procedure utilizzate siano confacenti alle specifiche dichiarate.

Il CQI deve essere sempre eseguito dal laboratorio su tutte le procedure o almeno su quelle più importanti e più frequenti: sono necessarie quindi risorse economiche ed umane che presuppongono un impegno notevole da parte dello staff tecnico predisposto alla sua esecuzione e verifica.

Debbono essere controllati tutti quei fattori che possono causare errori nelle metodologie impiegate dal laboratorio quali:

- a) strumentazione utilizzata, in particolare verificando costantemente le temperature di frigoriferi, congelatori e termostati;
- b) sistemi impiegati per l'identificazione dei batteri isolati, impiegando ceppi di riferimento ATCC;
- c) terreni di coltura preparati "in casa" per verificarne le caratteristiche di fertilità e selettività. Se i terreni sono acquistati pronti esigere un certificato che attesti l'idoneità del terreno all'uso indicato e, comunque, eseguire periodicamente dei controlli con

ceppi standard per assicurarci della validità dei lotti inviati che possono fortemente risentire anche di errori nella conservazione e nel trasporto da parte della ditta fornitrice. La periodicità dei controlli varia in relazione alla frequenza dei problemi riscontrati ma deve essere comunque definita per iscritto e seguita dal personale del laboratorio nei tempi indicati.

I risultati del controllo debbono essere sempre trascritti su idonee carte di controllo nelle quali è riportata la data della prova e l'esito della stessa con la firma di chi ha effettuato il test.

Nel caso degli antibiogrammi dobbiamo verificare che il sistema da noi adottato dia risposte corrette, in termini di grandezza degli aloni d'inibizione o di valori delle MIC, impiegando ceppi di controllo ATCC ed i riferimenti proposti per i singoli farmaci dalle tabelle NCCLS. Se i risultati ottenuti rientrano in quelli previsti il laboratorio è riuscito a standardizzare la metodica e quindi i risultati ottenuti nella routine possono essere considerati affidabili, in quanto riproducibili con il sistema analitico impiegato: il CQI permette quindi di assicurare una buona precisione della risposta.

Queste condizioni sono necessarie anche per ottenere buone performance nei programmi di VEQ.

Il CQI per gli antibiogrammi è eseguito, almeno in Italia, secondo le norme proposte dal NCCLS americano che sono diverse per i metodi di diffusione in agar e per la determinazione delle MIC.

Per il metodo di diffusione in agar (Kirby-Bauer) s'impiegano vari stipiti di riferimento di cui i più usati sono *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (che serve per controllare i risultati ottenuti con stafilococchi ed enterococchi), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; altri ceppi ATCC si usano per ricerche particolari quali meticillina resistenza, evidenza di produzione di ES β L, ed altre, e sono indicati nelle tabelle di riferimento NCCLS.

I ceppi di controllo si acquistano da varie ditte e si trovano in forma liofilizzata; dopo la ricostituzione si seminano su piastre di terreno adeguate da cui si possono trasferire in agar nutriente messo in provette a becco di clarino, nelle quali si conservano bene per circa 15 giorni in frigorifero, dopo di che devono essere nuovamente subcoltivati.

Durante questi passaggi può succedere che il ceppo subisca delle mutazioni o modificazioni del profilo di sensibilità ad uno o più antibiotici, oppure può essere stata contaminata la coltura con altri batteri; in tal caso lo stipite deve essere rimpiazzato con un altro della stessa specie.

Il controllo si esegue saggiando i ceppi verso i singoli antibiotici per 30 giorni consecutivi e per ciascuna combinazione di farmaco ed organismo non sono ammesse più di tre determinazioni al di fuori dei limiti indicati in tabella. Se tutto va bene si può, nella routine, considerare accettabile un controllo settimanale, ma se più di un valore su 20 è fuori range è necessario ripassare al controllo giornaliero, considerando risolto il problema se si ottengono i risultati previsti durante un periodo di 5 giorni consecutivi; altrimenti bisogna di nuovo ricorrere al controllo iniziale di 30 giorni. Questa procedura vale anche per la determinazione delle MIC.

I risultati ottenuti dalle singole prove debbono essere riportati sulle carte di controllo in cui sono indicati i limiti superiori ed inferiori: in tal modo è possibile individuare subito se la procedura è sotto controllo oppure prendere le misure necessarie per riportarla in ordine.

Con riferimento ai test di diffusione in agar si possono osservare i seguenti problemi:

- a) perdita dell'attività di alcuni antibiotici (penicillina, cefalosporine) evidenziabile da una riduzione graduale degli aloni d'inibizione;
- b) inoculo non corretto: se più ricco si formano aloni più piccoli mentre si ottiene il contrario con inoculi più poveri;
- c) quantità scarsa di terreno nella piastra: si ottengono aloni più grandi;
- d) non corretti valori di pH del terreno: con valori più alti si ottengono aloni più grandi con gli aminoglicosidi e più piccoli con le tetracicline, mentre si ottiene l'inverso con valori più bassi;
- e) nuovi lotti di terreno o dei dischi di antibiotici: si osservano improvvise variazioni della grandezza degli aloni d'inibizione. In questo caso è necessario fare una verifica eseguendo in parallelo la prova con il vecchio ed il nuovo lotto.

Altre possibili fonti d'errore possono essere le seguenti:

- 1) errori di misura o trascrizione degli aloni,
- 2) contaminazione della coltura del ceppo di riferimento o cambiamenti nelle risposte dovuti a varie cause,
- 3) errori nella preparazione del terreno o impiego di lotti non omogenei di terreno,
- 4) ritardo nel collocare i dischi dopo la semina dell'inoculo,
- 5) dischi appoggiati sul terreno e poi spostati,
- 6) ritardo nel mettere in termostato le piastre dopo avervi collocato i dischi.

Nel CQI per la determinazione delle MIC debbono essere impiegati i ceppi indicati dal produttore del sistema diagnostico che, di solito, sono gli stessi proposti da NCCLS e che sono identici a quelli usati per i test di diffusione tranne per lo *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e per l'*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Debbono essere eseguite procedure particolari per l'*Hemophilus influenzae*, che prevede un test di diluizione in brodo HTM, per lo *Streptococcus pneumoniae* (diluizione in brodo con sangue lisato di cavallo) e per *Neisseria gonorrhoeae* (diluizione in agar GC con supplemento senza cisteina).

È necessario inserire un ceppo di controllo per ciascun lotto di test (ad esempio i vari tipi di pannelli impiegati), verificandone sempre la corretta crescita nel pozzetto di controllo e la purezza, eseguendo una coltura su idoneo terreno: infatti, a differenza dei test di diffusione in agar, in questo caso non è possibile accorgerci visivamente di una contaminazione se non si osservano grossolane variazioni nelle risposte o crescite anomale.

Le prove si eseguono confrontando i valori ottenuti con quelli indicati nelle tabelle allegate alla metodica, in cui sono riportati i range al cui interno debbono cadere i valori delle MIC ottenute con i ceppi di riferimento: è ammesso un valore inferiore alla concentrazione più bassa d'antibiotico oppure maggiore alla concentrazione più elevata.

Possibili fonti d'errore nella determinazione delle MIC sono:

- a) non corrette condizioni di stoccaggio dei pannelli,
- b) errori nella dispensazione dell'inoculo,
- c) inoculo non corretto,
- d) contaminazione o cambiamenti del ceppo di controllo,
- e) non corretta temperatura o tempo d'incubazione,
- f) mancanza dell'antibiotico nel pozzetto.

Tuttavia, indipendentemente dal tipo di antibiogramma impiegato dal laboratorio, ci si può accorgere che qualche cosa non funziona come dovrebbe quando si osservano dei risultati atipici quali ad esempio i seguenti: *Streptococcus pyogenes* resistente a penicillina, stafilococchi resistenti all'oxacillina e sensibili alla penicillina, enterobatteri resistenti ad amoxicillina/acido clavulanico e sensibili ad amoxicillina oppure resistenti ai carbapenemici, *Proteus* spp. sensibili a nitrofurantoina, *Pseudomonas aeruginosa* sensibile ad acido nalidixico, cefalosporine di 1^a generazione e cotrimossazolo, *Stenotrophomonas maltophilia* sensibile ad imipenem.

In tutti questi casi è opportuno verificare le cause del risultato atipico prima di emettere un referto che potrebbe risultare non valido.

Il controllo di qualità esterno o, meglio, la valutazione esterna di qualità (VEQ) è uno strumento che ci permette di riconoscere la presenza di problemi tecnici del laboratorio, pur senza avere la possibilità di risolverli direttamente; è comunque possibile intervenire sulle cause che hanno portato all'errore (ad esempio: erronea identificazione batterica o errore nella valutazione del profilo di sensibilità e/o resistenza ad uno o più antibiotici).

La VEQ permette di verificare l'efficacia del sistema di qualità approntato dal laboratorio perché si mette a confronto il risultato ottenuto con quello indicato da un ente esterno qualificato e che funge da riferimento: in questo caso si riesce a valutare l'accuratezza della risposta del singolo laboratorio e, cosa non meno importante, si può confrontare con quella di tutti gli altri partecipanti a questo tipo di controllo. In questo modo abbiamo la possibilità di vedere in che posizione si colloca il laboratorio in una classifica generale: ciò può essere gratificante ma anche indicare una situazione non brillante che deve comunque incoraggiare al miglioramento.

La VEQ non serve quindi per monitorare la qualità globale del laboratorio e non ci permette di risolvere i problemi incontrati, ma ci spinge a modificare le procedure che hanno portato all'errore per evitare che sia ripetuto nel tempo.

La VEQ è gestita da organismi indipendenti, che propongono uno o più tipi di schemi cui si può aderire in tutto o per la parte che interessa: di questi uno dei più conosciuti è il NEQAS, accreditato dal Clinical Pathology Accreditation inglese. Negli ultimi anni anche alcune Regioni italiane si sono fatte carico di affrontare il problema e propongono un loro programma di VEQ: tra queste la Regione Toscana è quella che ha raccolto un grande numero d'adesioni di laboratori pubblici e privati e gestisce direttamente tutto il programma, dall'invio dei campioni alla valutazione ed elaborazione dei risultati inviati.

Di norma l'adesione alla VEQ è volontaria, ma diventa obbligatoria per il laboratorio che ha fatto domanda di accreditamento istituzionale con la propria Regione.

Lo schema prevede l'invio di campioni liofilizzati con un numero di spedizioni definite al momento dell'iscrizione al programma che, difficilmente, impegna il laboratorio su tutti i fronti di propria competenza tecnica, limitandosi in genere ad alcuni aspetti particolari, pur se significativi, per individuare comportamenti errati.

I campioni della VEQ dovrebbero essere legati alle caratteristiche diagnostiche del laboratorio che ha deciso di partecipare e dovrebbero quindi fare riferimento a quanto eseguito nella routine, anche se occasionalmente possono essere inviati liofilati contenenti batteri difficili da identificare a livello di specie o inusuali, con l'intento di spingere lo staff tecnico ad un continuo miglioramento professionale.

In pratica con l'adesione ad un programma di VEQ si esaminano dei campioni biologici noti (anche se non reali in quanto si presentano sempre sotto forma di materiale liofilizzato) ma a contenuto batterico sconosciuto: l'impegno del laboratorio consiste nell'identificazione del microrganismo isolato a livello di specie e nell'esecuzione di un antibiogramma su un ceppo standard di cui sono stati definiti i limiti di riferimento, sia in termini di aloni d'inibizione della crescita, sia di valori delle MIC.

Fondamentalmente quindi gli scopi di un programma di VEQ sono i seguenti:

- a) scopo educativo per il laboratorio partecipante che dovrebbe essere spinto a migliorare le proprie prestazioni armonizzandole con quelle degli altri laboratori partecipanti;
- b) individuare i propri limiti o problemi diagnostici;
- c) confrontare la propria performance con quella degli altri partecipanti.

L'impossibilità pratica d'inviare un campione della VEQ come un normale materiale biologico e, quindi, la necessità di esaminare il liofilizzato contenuto nel flaconcino, costituisce un aspetto negativo in quanto induce il tecnico a trattarlo in maniera privilegiata e con maggiori attenzioni, vanificando in parte l'aspetto più importante e cioè la capacità di ottenere risposte valide nella normale routine del laboratorio.

In ogni caso se si riscontra un errore debbono essere messe in atto alcune importanti operazioni:

- a) capire che tipo d'errore è stato commesso;
- b) individuare se si tratta di un problema tecnico o interpretativo (ad esempio, errata trascrizione di un alone d'inibizione o di un valore della MIC);
- c) in base al tipo d'errore verificare la validità dei terreni di coltura e dei sistemi diagnostici impiegati (dischi d'antibiotici o pannelli) e le loro date di scadenza;
- d) rivedere le carte di controllo del CQI eseguite con i ceppi di riferimento;
- e) individuare chi ha trattato il campione di controllo, chi ne ha autorizzato la refertazione e chi ha inviato la risposta all'Ente organizzatore della VEQ.

Tutti coloro che hanno ancora dubbi sui controlli di qualità possono fare ricerche in merito visitando alcuni siti Web, in particolare il CDC di Atlanta (USA), in cui possono trovare risposte a molte domande di carattere generale o specifico, o fare riferimento ai manuali o documenti del NCCLS.

Siti internet consigliati

Sono riportati una serie di siti Web di vario interesse microbiologico che risultavano attivi al momento della compilazione di questo manuale, ma di cui non garantiamo la validità o l'accessibilità nel tempo.

www.amcli.it (Associazione Microbiologi Clinici Italiani)

www.anaerobe.org (Società Americana per i batteri anaerobi)

www.apic.org (Società dei professionisti per il controllo delle infezioni ed epidemiologia)

www.asm.org (Sito American Society of Microbiology)

www.mic.ki.se/Diseases/C01.html (Sito del Karolinska Institut per le infezioni batteriche e micosi)

www.apsi.it (Associazione Italiana per la prevenzione e studio infezioni)

www.simmoc.it (Società italiana di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica)

www.cat.cc.md.us/courses/bio141/labmanua/toc.html (Manuale di Microbiologia per laboratorio)

<http://bmj.bmjournals.com/cgi/collection/microbiology> (Sito del British Medical Journal)

www.cellsalive.com (Nozioni e video di Microbiologia ed Immunologia)

www.cdc.gov (Sito del Center for Diseases Control and Prevention)

www.cdc.gov/ncidod/dbmd/ (Sito CDC Divisione malattie batteriche e da miceti)

<http://www.phppo.cdc.gov/dls/master/ams/intro/open.swf> (Corso interattivo del CDC)

www.niaid.nih.gov/publications/microbes.htm (Sito dell'Istituto Nazionale per l'Allergia e le Malattie Infettive)

<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/> (Lo zoo dei microbi)

www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no2/contents.htm (Emerging Infectious Diseases)

www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/ (Potente motore di ricerca per argomenti di medicina della National Library of Medicine)

www.simi.iss.it (Sito dell'Istituto Superiore di Sanità)

www.escmid.org (Società europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive)

www.eurosurveillance.org (Sito europeo sulle infezioni causate da agenti sottoposti a denuncia obbligatoria)

www.fda.gov (Sito della Food and Drug Administration)

www.lib.uiowa.edu/hardin/md/micro.html (Immagini varie)

www.ministerosalute.it/promozione/malattie/malattie.jsp (Sito del Ministero della Salute sulle malattie infettive)

<http://jcm.asm.org> (Sito del Journal of Clinical Microbiology)

www.phls.co.uk/default.htm (Sito del Public Health Laboratory Service)

http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072320419/student_view0/ (Sito della McGraw Hill: centro d'insegnamento on line per la Microbiologia)

<http://gsbs.utmb.edu./microbook/toc.htm> (Libro completo di Microbiologia clinica)

<http://www.med.sc.edu:85/book/bact-sta.htm> (Microbiologia ed Immunologia on-line: University of South Carolina)

www2.austin.cc.tx.us/microbugz/labindex.html (Indice del Laboratorio di Microbiologia: University of Austin)

www.u.arizona.edu/ic/srl/micro/micro.html (Programma di tecnologia medica dell'Università dell'Arizona)

www.cdc.gov/mmwr/mmwr_wk.htm (Morbidity and mortality weekly report)

www.nccls.org (Sito del NCCLS)

<http://cancerweb.ncl.ac.uk/omd> (On line Medical Dictionary)

www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htm (Immagini di batteri)

www.helico.com/index.html#main_index (Sito della Fondazione per lo studio dell' *Helicobacter*)

<http://www-micro.msb.le.ac.uk/Video/Video.html> (Video libreria di Microbiologia: University of Leicester)

www.bacteriamuseum.org (Museo dei batteri)

<http://warn.utia.cas.cz/> (Sito del World Antibiotic Resistance Network)

www.who.int/en (Sito del WHO)

<http://textbookofbacteriology.net/> (Testo di batteriologia on-line)

Indice analitico

- Abiotrophia* 35
Acido bórico 8
Acido clavulanico 69, 74, 133
Acido nalidixico 79
Acinetobacter 86
Acinetobacter baumannii 86
Acinetobacter lwoffii 86
Acqua peptonata 76
Actinobacillus 81, 91
Actinobacillus actinomycescomitans 81, 91
Actinomiceti aerobi 60
Actinomiceti anaerobi 100
Actinomyces 100, 101
Actinomyces israelii 101
Actinomyces bovis 101
Actinomyces meyeri 101
Aeromonas 75
Aeromonas hydrophila 76
Aerosol 110
Agar cromogenico 29, 33, 37, 70
Agar A7 32, 119
Agar BCYE 25, 87
Agar Bordet e Gengou 89
Agar Brucella 88
Agar CCFA (cicloserina, cefoxitina, fruttosio) 105
Agar CLED 42, 60
Agar CIN 75
Agar cioccolato 20, 22, 52, 81
Agar cioccolato con bacitracina 20, 22, 81
Agar cistina-tellurito 6, 60
Agar CPSID 37, 48
Agar di Dent 79
Agar Hektoen 33, 70, 71
Agar di Loeffler 6, 60
Agar MacConkey 20, 68, 71
Agar di Mueller-Hinton 35, 39, 42, 58, 125
Agar Mycosel 27
Agar New York City 26
Agar Pea (alcol feniletico) 20, 59, 99
Agar PPLO 119
Agar Pseudosel 27
Agar Rogosa 65
Agar Sabouraud 22, 27, 31
Agar sale mannite 20, 45
Agar Salmonella Shigella (SS) 33, 70, 71
Agar sangue Columbia 20
Agar sangue Columbia con CNA 20, 38
Agar Schaedler 20
Agar SMID 71
Agar SP4 119
Agar Tayer-Martin 54, 26
Agar TCBS 76
Agar di Tinsdale 60
Agar triptosio 20
Agar XLD 33, 69
Albert, colorazione di 6
Alcaligenes 86
 α emolisi 35
Alte vie respiratorie 5, 26
Aminoglicosidi 42
Anaerobiosi 97
Angina di Vincent 5, 26
Ansa calibrata 16, 29
Antibiogramma 123
Antibiotici β -lattamici 42, 46
Antigene di *Streptococcus pyogenes* 27, 36
Antigeni solubili:
 di *Legionella* 25
 di Pneumococco 25
 nel *liquor* 12, 22, 52
Apparato gastro-enterico 4
Apparato genitale ed urinario 4, 7, 28
Apparato respiratorio 4
Apparato tegumentario 4
Arcanobacterium haemolyticum 26, 62
Ascessi 12
Aspergillus 7, 27
Aspirato bronchiale 25
Autoagglutinazione 52
Bacilli Gram negativi 67
Bacilli Gram negativi anaerobi 105
Bacilli Gram positivi aerobi 56
Bacilli Gram positivi sporigeni 103
Bacilli filamentosi 62
Bacilli Gram positivi rari 65

- Bacillus* 58
Bacillus anthracis 58
Bacillus cereus 59
Bacillus stearothermophilus 31
Bacillus subtilis 58
 Bacitracina 36, 37
Bacteroides 106
Bacteroides fragilis 106
 Bartlett, schema di 24
Bartonella 94
 Basse vie respiratorie 6, 23
 Batteri alcol-acido resistenti 109, 111
 Batteri anaerobi 97
 Batteri corineformi (difteroidi) 61
 Batteri “*fastidious*” 30, 125
 Batteri Gram negativi rari 91
 Batteri Gram positivi rari 65
 Batteri produttori di β -lattamasi 132
 Batterioscopico 9, 11
 Batteriemia 53
 Batteriemia continua 11
 β emolisi 35, 45
 β lattamasi 54, 56, 82, 132
 β lattamasi a spettro allargato (ESBL) 132
Bifidobacterium 102
 Bioterrorismo 58
Bordetella 89
Bordetella pertussis 27, 89
Borrelia 93
 Botulismo 104
 Break point 47
 Brodo al tioglicollato 99
 Brodo selenito 33, 70
 Brodo Todd-Hewitt 26
Brucella 88
Brucella abortus 88
Brucella melitensis 88
Brucella suis 88
 Brucellosi 8
Burkholderia cepacia 84
 Camp test 57
Campylobacter 77
Campylobacter coli 78
Campylobacter jejuni 78
Campylobacter lari 78
Candida 9, 10, 19, 25, 28, 31
 Candidosi orale 6, 27
 Candle jar 87, 88, 89
Capnocytophaga 91
 Cappe biologiche di classe II 52, 89, 110
Cardiobacterium hominis 91
 Carica batterica 16, 29, 30
 Catalasi 41
 Catetere a permanenza 8, 30
 Cateteri vascolari 11, 20
 Cavità orale 4
 Cefalexina 27
 Cefalosporine 41, 54
 Cefalotina 79
 Cellule epiteliali del cavo orale 23
 Ceppi ATCC 136
 Ceppi CoNS 46, 47
 Ceppi enteroaggreganti (EaggEC) 67
 Ceppi enteroemorraggici (EHEC) 67
 Ceppi enteroinvasivi (EIEC) 67
 Ceppi enteropatogeni (EPEC) 67
 Ceppi enterotossici (ETEC) 67
 Ceppi GISE 43
 Ceppi MRCoNS 44
 Ceppi MRSA 44
 Ceppi VISA 129
 Ceppi VRE 43
 Ceppi VRSA 129
 Cervice uterina 9
Chlamydia pneumoniae 121
Chlamydia psittaci 121
Chlamydia trachomatis 8, 29, 30, 53, 121
Chromobacterium 91
 Citotossina 105
Citrobacter amalonaticus 72
Citrobacter diversus 72
Citrobacter freundii 72
Citrobacter koseri 72
 Clindamicina 36, 130
Clostridium botulinum 104
Clostridium difficile 104
Clostridium perfringens 103
Clostridium tetani 104
 Coagulasi 45
 Clue cells 9
 Clumping factor 45, 49
 Cocchi a “chicco di caffè” 51
 Cocchi Gram negativi aerobi 51
 Cocchi Gram negativi anaerobi 100
 Cocchi Gram positivi aerobi 35
 Cocchi Gram positivi anaerobi 100
 Colera 76
 Colite pseudomembranosa 104

- Colonia a "caput medusae" 59
 Colonia a goccia di mercurio 90
 Colonia a goccia di rugiada 38
 Colonia a pedina di dama 38
 Colonia a riccio 32
 Colonia ad uovo fritto 32
 Colonia a vetro smerigliato 59
 Colorazione auramina-rodamina 22, 111
 Colorazione con impregnazione argentea 93
 Colorazione con inchiostro di china 22
 Colorazione di Dienes 120
 Colorazione di Giemsa 93
 Colorazione di Gimenez 87
 Colorazione di Gram 15, 31, 33
 Colorazione di Kinyoun 62
 Colorazione di Wright 93
 Colorazione di Ziehl-Neelsen 22, 111
 Coltura del liquor-cefalorachidiano 22
 Coltura batterica 15
 Colture cellulari 32, 122
 Congiuntivite 53, 81
 Controlli di qualità 123, 135
 Contaminazione 11
 Coprocultura 32
 Corinebatteri 60, 61
Corynebacterium diphtheriae 60
Coxiella 95
 CQI (controllo qualità interno) 123, 135
 Criptococchi 22
 Diarrea del viaggiatore 67
 Difterite 60
 Dip slides 29
 Doppio disco (metodo del) 133
 Early onset disease 37
Eikenella 91
 Elisa, test 90, 93, 95
 Emocultura 19
 Emolisi α 35
 Emolisi β 35, 45
 Endocardite 41
Enterobacter aerogenes 72
Enterobacter cloacae 72
 Enterite *Shigella* like 68
Enterobacteriaceae 67
 Enterobatteri 67
 Enterococchi 41
Enterococcus faecalis 41
Enterococcus faecium 41
 Enterococchi HLAR 42
 Enterocolite 75, 78
 Enterotossina 105
 Epitelio vaginale 8
 Eritromicina 36, 61, 79
Erisipelotrix 63
Escherichia coli 67
Escherichia coli O157:H7 68
 Esotossine 103
 Espettorato 6, 23
 Essudato congiuntivale 12
 Età prepubere 8
 E-test 39, 80, 125
Eubacterium 102
 Faringotonsillite 27, 35
 Fascite necrotizzante 35
 Fattori di crescita (X, V, XV) 82
 Febbre Q 95
 Fenotipi di resistenza (di *Streptococcus pyogenes*)
 36
 Fibrosi cistica 84
 Filtri per batteriologia 119
 Fissaggio alla fiamma 15
 Flora endogena 3
Flavobacterium meningosepticum 87
 Fosse nasali 4
Francisella tularensis 90
Fusobacterium necrophorum 106
 Gangrena gassosa 104
Gardnerella vaginalis 9, 29, 31, 64
 Genitali esterni 4
Giardia lamblia 10
 Glicopeptidi 42, 46
Graulichatella 35
 Granuli di zolfo 101
 Gravidanza 9
 HACEK (batteri del gruppo) 81
Haemophilus influenzae 81
Haemophilus parainfluenzae 81
Hafnia alvei 72
 HLAR, enterococchi 42
Helicobacter pylori 79
 HPLC 114
 Immunocromatografici, metodi 88
 Immunoenzimatici, metodi 94, 95
 Immunofluorescenza 90, 95
 Identificazione biochimica 34
 Identificazione di specie 34
 Idoneità del campione (espettorato) 23
 Infezioni apparato digerente 10

- Ippurato (prova dell') 37
 Isolamento, tecnica per 16
Kingella kingae 81, 91
 Kirby-Bauer, metodo di 21, 125
Klebsiella oxytoca 72
Klebsiella pneumoniae 72
 Koch, Robert 1
Lactobacillus 65, 102
 Lancefield, tipizzazione di 35
 Late onset disease 37
 Lattobacilli 8
 Lavaggio bronchiale 7
 Lavaggio bronco-alveolare 7, 25
 Lavaggio bronco-alveolare protetto 7
Legionella pneumophila 87
Leptospiraceae 94
 Leucocituria 29
 Leucorrea 9
 Linfadenite mesenterica 75
 Liquido articolare 11
 Liquido ascitico 11
 Liquido di drenaggio 11
 Liquido pericardico 11
 Liquido pleurico 7
 Liquido prostatico 9
 Liquido seminale 10
 Liquido sinoviale 11
 Liquor cefalo-rachidiano 11, 22
Listeria monocytogenes 22, 57
 Lue 93
 Maeres e Stamey, test di 9
 Malattia di Lyme 93
 McFarland 21, 126
 Meningite batterica 22, 52, 56
 Menopausa 9
 Meticillina 44, 46, 47
 Metodi colturali 15
 Metodo delle proporzioni 115
 Metronidazolo 65
 MIC 128, 137
 Miceti dimorfi 26
 Micetoma 62
 Micobatteri 20, 109
 Micoplasmi 119
 Microaerofilia 33, 77
Micrococcus 44
 Microscopio semplice 1
 Midollo spinale 88
 Mitto intermedio 8
Mobiluncus 9, 64, 102
Monaxella catarrhalis 55
Morganella morganii 73
 Motilità a cavatappo 77
Mycobacterium africanum 109
Mycobacterium avium intracellulare 109
Mycobacterium bovis 109
Mycobacterium kansasii 109
Mycobacterium tuberculosis 30, 110
Mycoplasma hominis 119
Mycoplasma genitalium 119
Mycoplasma pneumoniae 119
 N-acetil-L-cisteina 112
 NAP test 114
 NCCLS 39, 46, 55, 56, 58, 123
Neisseria gonorrhoeae 53, 9, 32
Neisseria meningitidis 51
 Nitrocefina 54, 56
Nocardia 62
Nocardia asteroides 62
Nocardia brasiliensis 62
 Novobiocina 48
 NTM (nontuberculous mycobacteria) 109
 Odore di gesso 63
 Odore di lievito di birra 32
 Odore di muffa 63
 Odore di topo 82
 Odore fetido 98
 Optochina 38
 Ornitosi 121
 Orofaringe 4
 Ossidasi 52
 Otite cronica 28
 Otite esterna 6, 28
 Otite media acuta 6, 28
 Oxacillina 47
 Par test 17, 30
 Pasteur, Louis 1
Pasteurella multocida 91
 Penicillina 54, 56, 80, 36
Peptococcus 100
Peptostreptococcus 100
 Peritoneo 4
 Pertosse 89
 Petri, Richard Julius 1
 Piastra di Petri 1
 PID (pelvic inflammatory disease) 53
 Pirrolidonil-B-naftilamide (PYR) 42
 Piuria 31

- Pneumocystis carinii* 7
 Polmonite "ab ingestis" 98
 Popolazione batterica residente 4
Porphyromonas 106
 Portatore orofaringeo 5
Prevotella melaninogenica 106
Propionibacterium acnes 102
 Prostatite acuta 9
 Prostatite cronica 9
Proteus mirabilis 73
Proteus penneri 73
Proteus vulgaris 73
Providencia rettgeri 73
Providencia stuartii 73
 Pseudocatalasi 41
Pseudomonas aeruginosa 82
Pseudomonas fluorescens 84
Pseudomonas putida 84
 Resistenza, agli antibiotici 125
 Resistenza MLS_B 130
Rickettsiae 95
 Rinofaringe 4
Rhodococcus equi 63
Rotavirus 10
 Sacchetto sterile, raccolta urina 8
 Saliva 7
Salmonella 69
 Satellitismo 40
 Sciamaggio 73
 Secrezione balano-prepuziale 10
 Semina semiquantitativa 16
 Sensibilità, agli antibiotici 124
 Sensibilità intermedia, agli antibiotici 125
Serratia marcescens 74
 Setticemia 19
Shigella boydii 70
Shigella dysenteriae 70
Shigella flexneri 70
Shigella sonnei 70
 Shock etanoloico 105
 Shock termico 52, 105
 Sifilide 93
 Sindrome uremico-emolitica (HUS) 68
 Sindrome uretrale 29
 Sistemi automatici 34
 Sistemi identificativi 34
 Siti di norma sterili 4
 Slime 47
 Sodio polietanolsulfonato (SPS) 54
 Solubilità in bile 38
 Spirale uterina 101
 Spore 103
 Stafilococchi 43
 Stafilococchi coagulasi negativi 44
Staphylococcus aureus 44
Staphylococcus epidermidis 46
Staphylococcus haemolyticus 48
Staphylococcus hominis 49
Staphylococcus lugdunensis 45, 49
Staphylococcus saprophyticus 48
Staphylococcus schleiferi 45
Stenotrophomonas maltophilia 85
Streptobacillus 91
 Streptococchi 35
 Streptococchi α -emolitici (viridanti) 20
 Streptococchi β -emolitici 35
 Streptococchi non emolitici 40
Streptococcus agalactiae 9, 31, 37
Streptococcus bovis 20, 40
Streptococcus pneumoniae 38
Streptococcus pyogenes 35, 130
 Streptomina 42
 Tampone auricolare 6, 27
 Tampone cervicale 9, 32
 Tampone faringeo 5, 26
 Tampone nasale 6
 Tampone naso-faringeo 6, 27
 Tampone orale 6, 27
 Tampone rettale 70
 Tampone uretrale 8
 Tampone vaginale 8, 31
 Tecniche di semina in piastra 16
 Teicoplanina 43
 Terreno di Fletcher 95
 Terreno di Loeffler 6, 26
 Terreno di Lowenstein-Jensen 22, 112
 Terreno di Stuart 26, 54
 Tetano 104
 Tetraciclina 54
 Timpanocentesi 28
 Tossina difterica 60
 Tossina LT 67
 Tossina ST 67
 Tossinfezioni alimentari 10, 44
Treponema pallidum 93
Trichomonas vaginalis 9, 32
 Tubo germinativo 32
 Tularemia 90

- Ulcera da decubito 12
Ureaplasma urealyticum 9, 119
Uretra 4
Uretrite 8
Urina 7
Urinocoltura 7, 28
Ustioni 12
Veillonella 100
Vaginosi batterica 9, 64
Van Leeuwenhoek, Antony 1
Vancomicina 43, 46, 62, 97
VEQ (valutazione esterna di qualità) 123, 135
Vibrio cholerae 76
Vibrio El Tor 76
Vibrio parahaemolyticus 76
VTEC (*E. coli* produttori di verocitotossina) 68
Yersinia enterocolitica 75
Weil-Felix, reazione di 95
Western Blot 93
Zoonosi 94

Il manuale vuole rappresentare l'essenza della batteriologia di un laboratorio di dimensioni medio-grandi, indicandone gli aspetti operativi con schemi semplici, facilmente applicabili, derivanti dalla lunga esperienza maturata dall'autore nel settore e da alcune proposte operative dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani.

Il libro si propone di fornire uno strumento di facile consultazione, ma utile per migliorare la qualità del lavoro e contribuire all'aggiornamento culturale e professionale degli operatori sanitari interessati alla batteriologia clinica. Il manuale è corredato d'immagini digitali ad alta definizione che evidenziano le caratteristiche macroscopiche e microscopiche dei batteri e di una lista di siti Web dove il lettore può trovare valido aiuto nel chiarire aspetti non trattati in maniera approfondita nel manuale.

Roberto Rossetti, laureato in Scienze Biologiche presso l'Università di Firenze, specializzato in Igiene e Sanità Pubblica presso l'Università di Pisa, dal 1990 è Direttore U.O. Microbiologia degli Spedali Riuniti di Pistoia. Dal 1997 è professore a contratto dell'Università di Firenze per l'insegnamento di Microbiologia Clinica nel Corso di Laurea per Infermieri Professionali nella sezione distaccata di Pistoia.