

LINEE GUIDA PER LA CORRETTA ESECUZIONE DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE RELATIVE A PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA (aggiornamento del 22/03/06)

RACCOLTA DEI CAMPIONI: Per quanto riguarda i pazienti non espettoranti si raccomanda di eseguire sempre l'aspirato ipofaringeo: deve essere effettuato dopo la seduta fisioterapica, stimolando il colpo di tosse ed impiegando un sondino sterile da aspirazione con una grossa siringa; il sondino viene successivamente reciso entro una provetta sterile o direttamente in un contenitore con un idoneo terreno di trasporto.

Per quanto riguarda l'esecuzione del tampone faringeo va ricordato che i suoi risultati possono essere fuorvianti: se però si ha cura di eseguirlo correttamente stimolando il colpo di tosse (1, 2) riflette con una certa fedeltà la flora microbica presente nelle basse vie respiratorie.

Per i pazienti in grado di produrre espettorato si raccomanda la raccolta previa esecuzione di un lavaggio orale eseguito con acqua e con l'ausilio di uno spazzolino.

CONSERVAZIONE: Tutti i campioni devono essere immediatamente consegnati al laboratorio; qualora non sia possibile processarli immediatamente si consiglia di conservarli a 4°C.

Qualora vengano ricevuti campioni che hanno soggiornato in frigorifero o a temperatura ambiente per tempi più lunghi (es: campioni ricevuti per posta), è consigliata l'indicazione nel referto delle limitazioni di un esame eseguito su tali campioni.

Data la particolare viscosità delle secrezioni bronchiali dei pazienti FC, è sempre consigliabile la fluidificazione dell'espettorato da eseguirsi con omogenizzatori o con l'utilizzo di mucolitici previa separazione della parte più densa del campione (quest'ultimo accorgimento è particolarmente importante per l'esecuzione corretta della conta batterica).

Il **ditiotreitolo** è consigliato quale mucolitico di prima scelta; per quanto riguarda l'**acetilcisteina**, anch'essa mucolitico di largo uso, esistono alcune evidenze che indicherebbero una certa sua attività inibente sulla crescita batterica (1).

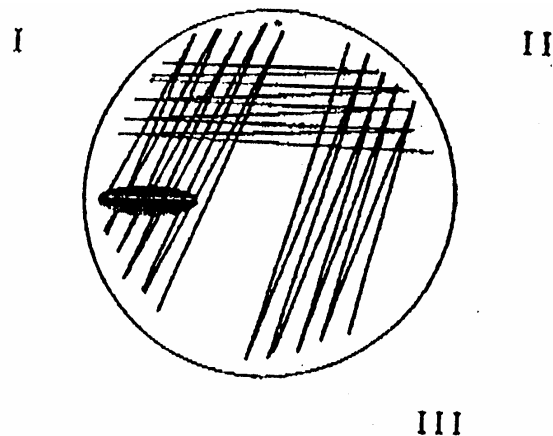
PERIODICITA': Le indagini microbiologiche nei pazienti FC devono essere eseguite almeno con cadenza trimestrale o al momento della riacutizzazione.

OSSERVAZIONE MICROSCOPICA': E' consigliato l'esame microscopico dei campioni di espettorato, in quanto oltre a consentire la valutazione dell'idoneità del campione, permette anche l'identificazione presuntiva dei microrganismi presenti (3). Tuttavia per i campioni di espettorato provenienti da pazienti FC non è ritenuta indispensabile: infatti tali pazienti presentano in genere un'espettorazione abbondante e purulenta, già indice di provenienza dalle basse vie respiratorie, che facilmente soddisfa i criteri che definiscono l'idoneità del campione.

CARICA BATTERICA: L'indicazione quantitativa della carica batterica è ritenuta indispensabile per il clinico in quanto indice dell'efficacia della terapia antibiotica; si ritiene tuttavia sufficiente una semplice indicazione semiquantitativa della carica.

E' consigliata la tecnica semiquantitativa messa punto dal Centro Danese FC diretto dal Prof. Høiby:

1. Diluire il materiale più purulento del campione 1:1(v/v) con ditiotreitolo, lasciando il campione per 60 minuti a temperatura ambiente o per 30 minuti in termostato a 35-37°C. Se la carica batterica è elevata si può effettuare un'ulteriore diluizione per facilitare l'isolamento del patogeno.
2. Seminare le piastre usando la tecnica delle "tre zone", depositando 20 µl del campione e strisciare 5 linee avanti e 5 linee indietro per ogni quadrante come di seguito indicato:



3. Quantificare la crescita come segue:

carica semiquantitativa	I quadrante	II quadrante	III quadrante	carica <u>approssimativa</u> (CFU/ml) seminando 20 μ l (dopo fluidificazione)
+	< 10			10^3
++	< 10	< 10		10^4
+++	> 10	> 10	< 10	10^5
++++	> 10	> 10	> 10	10^6

TERRENI DI COLTURA: Per un efficace isolamento di tutti i potenziali patogeni sono consigliati i seguenti

TERRENI INDISPENSABILI:

- **agar MacConkey o analoghi** (bacilli gram-negativi)
- **agar sale mannite** (*Staphylococcus aureus*)
- **agar cioccolato con bacitracina** (*Haemophilus* spp.): l'utilizzo del terreno addizionato con bacitracina è particolarmente raccomandato, in quanto l'isolamento di *Haemophilus* spp in agar cioccolato semplice è spesso reso impossibile dalla contemporanea crescita di *Pseudomonas aeruginosa*.
- **agar BCSA** (*Burkholderia cepacia*): è un terreno selettivo e differenziale indicato in letteratura come uno dei migliori per l'isolamento di *B. cepacia* (4). Il suo uso routinario è da ritenersi indispensabile: infatti in mancanza di un terreno selettivo la presenza di tale patogeno sfugge all'osservazione perché la sua crescita, piuttosto lenta, è coperta da quella di *P. aeruginosa*.
- **agar CNA**
- **agar sangue** (cocchi gram-positivi)

TERRENI OPZIONALI:

- **agar ceftrimide** (*Pseudomonas* spp.)
- **agar Sabouraud** (miceti): l'uso di tale terreno non è da ritenersi routinario, ma può essere limitato ai casi in cui esista una specifica richiesta del clinico.

L'incubazione di tutte le piastre deve essere protratta per due giorni a 35-37°C. Per l'isolamento di microrganismi a lenta crescita (es: *Alcaligenes xylosoxidans*, *B. cepacia*) è necessario protrarre l'incubazione del terreno idoneo per tre giorni. Per *B. cepacia* l'incubazione può essere prolungata fino ad una settimana (i primi 3-4 giorni a 37°C e poi a temperatura ambiente).

ANAEROBI

Dato che in alcuni casi gli anaerobi possono rivestire un ruolo patogeno nei pazienti FC, devono essere ricercati qualora vi sia una specifica richiesta del clinico e soltanto su campioni idonei per tale tipo di indagini.

STAFILOCOCCI METICILLINO-RESISTENTI

Gli *Stafilococchi* meticillino-resistenti sono patogeni nosocomiali isolati con frequenza crescente anche da pazienti FC. Tali microrganismi costituiscono un notevole problema clinico in quanto sono sensibili solo a pochissimi agenti chemioterapici: è quindi di fondamentale importanza effettuare, oltre ad una corretta identificazione, anche un'altrettanto corretta valutazione della meticillino-resistenza. Tale resistenza può essere valutata con metodi diversi: infatti oltre alle metodiche classiche agar e brodo diluizione, attualmente sono disponibili anche test di screening su piastra e test qualitativi rapidi con lettura in fluorescenza.

E' noto che l'espressione della meticillino-resistenza è notevolmente influenzata dalle condizioni con cui il test è eseguito, ed in particolare:

- il tipo di antibiotico con cui la resistenza è valutata, che preferibilmente deve essere oxacillina ad una concentrazione di 6 µg/ml se si utilizzano test di screening su piastra;
- l'incubazione, che deve essere protratta per 24 h a una temperatura di 30-35 °C;
- la concentrazione di NaCl, che deve essere 2% (w/v) per agar e brodo diluizione e 4% (w/v) per i test di screening su piastra;
- il terreno di coltura utilizzato, che deve essere CAMHB per brodo diluizione, MHA per agar diluizione e test di screening su piastra.

Soltanto il rispetto di tutte queste condizioni è infatti in grado di evidenziare la resistenza in tutti i ceppi di *Stafilococchi* (5,6).

Vengono consigliate le piastre "MRSA screen", che sono un esempio di test di screening su piastra, e il più affidabile ma ben più costoso "Crystal MRSA ID", un test qualitativo che avvalendosi di un indicatore fluorescente sensibile all'ossigeno è in grado di identificare con precisione ed in 4 ore i ceppi di *Stafilococchi* meticillino-resistenti. Entrambi i tipi di test sono commercializzati dalla Ditta Becton Dickinson.

Sthaphylococcus aureus "small colony variant" (SCVs)

Date le loro caratteristiche biochimiche (auxotrofismo per emina, menadione e/o timidina), queste varianti fenotipiche sono caratterizzate da crescita lenta con colonie piccole, non pigmentate, non emolitiche, altamente resistenti agli antibiotici (in particolare al cotrimossazolo). Per il loro isolamento ottimale si richiede l'incubazione dei terreni specifici per almeno 72 ore. Tali varianti non crescono su Mueller-Hinton Agar, per cui è necessario eseguire l'antibiogramma con Mueller-Hinton Agar con il 5% di sangue.

La valutazione della meticillino-resistenza deve essere effettuata testando la sensibilità alla cefoxitina (con dischetto da 30 µg su Agar Sangue Columbia) e/o seminando le colonie sospette su un terreno cromogeno specifico per MRSA che supporta anche la crescita di SCVs (MRSA ID, Biomerieux).

GRAM-NEGATIVI NON-FERMENTANTI

E' noto che i ceppi di *P. aeruginosa* isolati da pazienti FC presentano una notevole variabilità fenotipica (sono stati differenziati fino a 6 morfotipi), e che tali varianti possono manifestare una diversa sensibilità agli agenti chemioterapici. E' quindi di fondamentale importanza differenziare almeno i due morfotipi "rugoso" e "mucoide" ed eseguire gli antibiogrammi separatamente in quanto ogni morfotipo può presentare una diversa chemiosensibilità. Per quanto riguarda l'identificazione di *P. aeruginosa* e di *B. cepacia* vengono consigliati i seguenti metodi: il sistema ATB expression e le gallerie API (API 20 NE), entrambi della ditta Biomerieux.

L'identificazione di *B. cepacia* presenta maggiori difficoltà rispetto a quella di *P. aeruginosa* e si consiglia pertanto di ripetere l'identificazione utilizzando due metodi diversi o di eseguire test biochimici supplementari quali lisina- e ornitina-decarbossilasi e liquefazione della gelatina. Nel caso del *B. cepacia* complex potrebbe essere importante l'identificazione dei vari genomovar tramite metodiche molecolari (7).

VALUTAZIONE DELLA CHEMIOSENSIBILITA': Gli antibiotici, che devono essere testati con metodica manuale (Kirby-Bauer), sono indicativamente i seguenti per i Gram-negativi non-fermentanti:

AMINOGLICOSIDI	β-LATTAMICI	CHINOLONICI	
netilmicina	imipenem	ciprofloxacina	cotrimossazolo
tobramicina	piperacillina	levofloxacina	rifampicina
gentamicina	ticarcillina/clavulanato		cloramfenicolo
amikacina	ceftazidime		minociclina
	aztreonam		
	cefepime		
	meropenem		

definizione di ceppi multiresistenti (secondo la definizione della CFF): se presentano resistenza a tutti gli agenti di almeno due delle seguenti classi: β-lattamici (includendo imipenem ed aztreonam), chinolonici (ciprofloxacina), aminoglicosidi (tobramicina) su di essi si consiglia di testare anche meropenem, piperacillina/tazobactam e tetraciclina/cloramfenicolo.

Sui ceppi multiresistenti, al fine di evidenziare il possibile effetto sinergico esistente fra associazioni di antibiotici, si consiglia di testare per la sinergia: E test, agar diffusione con associazione di dischetti, time-killing, checkerboard (8), quelle associazioni che il clinico ritiene più significative (<http://cpmcnet.columbia.edu/synergy.htm>)

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Dati recenti riportano in Italia una percentuale di ceppi resistenti alla penicillina G intorno al 5%; si raccomanda pertanto di saggiare la resistenza di *Streptococcus pneumoniae* alla penicillina in agar diffusione su MHA supplementato con sangue di montone al 5% con un dischetto di oxacillina da 1µg: i ceppi che presentano una zona di inibizione ≥ 20 mm (MIC ≤ 0.06 µg/ml) sono da considerarsi sensibili alla penicillina e a tutte le altre β-lattamine. Per i ceppi che presentano un alone di inibizione ≤ 19 mm è consigliabile la determinazione delle MIC con il metodo della microdiluizione in brodo secondo le direttive del NCCLS.

INDAGINI SIEROLOGICHE

Il monitoraggio dell'infezione da *P. aeruginosa* è di vitale importanza nei pazienti FC in quanto consente di intervenire tempestivamente con una terapia antibiotica mirata.

Il passaggio da una colonizzazione superficiale ad una colonizzazione cronica non è sempre agevole sulla base delle sole evidenze batteriologiche (presenza di *P. aeruginosa* nell'escreato continuativamente per 6 mesi e in almeno 3 colture consecutive). Essendo la fase di infezione in genere accompagnata dalla stimolazione di una specifica risposta anticorpale, la valutazione della presenza di anticorpi circolanti anti-*P. aeruginosa* può costituire un notevole ausilio per evidenziare il passaggio alla fase cronica dell'infezione anti-*P. aeruginosa*.

Attualmente ci si può avvalere di metodiche sierologiche diverse per il monitoraggio dell'infezione da *P. aeruginosa*:

CIE : E' una metodica sierologica che presenta un buon potere analitico anche se la sensibilità non è elevatissima; non è molto costosa ma è laboriosa, evidenzia solo anticorpi precipitanti e consente di analizzare contemporaneamente un numero limitato di campioni (9).

ELISA: Consente di evidenziare anticorpi diretti contro antigeni specifici di *Pseudomonas aeruginosa*, ha una buona specificità e sensibilità (in genere maggiore di quella delle metodiche elettroforetiche) e si presta all'automazione anche se i costi sono maggiori rispetto alle metodiche precedenti (10).

TIPIZZAZIONE INTRASPECIFICA DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *BURKHOLDERIA CEPACIA* E *MRSA*

Importanza crescente viene attribuita alla tipizzazione di *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente al fine di chiarire le possibili vie di trasmissione di tali patogeni. Le tecniche maggiormente utilizzate a tale scopo sono: sierotipizzazione, biotipizzazione, tipizzazione piocinica e recentemente tecniche di biologia molecolare che utilizzano markers genetici (es. pulsed field gel electrophoresis, random amplified polymorphic DNA fingerprints). Data la notevole variabilità fenotipica che caratterizza i ceppi isolati da pazienti FC (molti di essi sono poliagglutinabili o non agglutinabili), molti autori consigliano di affiancare una delle tecniche tradizionali con una di quelle che basa il suo potere discriminante su caratteristiche genetiche dei germi in questione (11).

MICOBATTERI

Esistono in letteratura molti casi di isolamento di micobatteri da pazienti con FC; recentemente sono aumentate in maniera preoccupante le segnalazioni di micobatteri atipici. Il significato clinico dei micobatteri non tubercolari in tali pazienti è attualmente sconosciuto, tuttavia è importante che ne venga segnalata una eventuale presenza; l'identificazione dovrebbe essere su richiesta del clinico. Potrebbe essere utile l'utilizzazione di un Laboratorio Regionale di Riferimento a cui inviare i campioni a rischio per la presenza di micobatteri.

Nei pazienti FC colonizzati da *Pseudomonas aeruginosa* l'isolamento dei micobatteri presenta notevoli problemi tecnici in quanto tale batterio può sopravvivere alla decontaminazione eseguita con il metodo tradizionale: è quindi consigliabile in questi casi ricorrere all'utilizzo di acido ossalico in aggiunta alla normale decontaminazione come indicato in letteratura (12).

L'esame batterioscopico può essere eseguito previa colorazione di Ziehl-Neelsen o con auramina. L'esame colturale è da ritenersi indispensabile: infatti la resa dell'esame microscopico è scarsa per quanto riguarda i micobatteri non tubercolari.

Per quanto riguarda i micobatteri non tubercolari è stata documentata la crescita di *Mycobacterium chelonae* su BCSA, dopo circa 10 giorni dalla semina del campione, preceduta da un caratteristico odore di muffa. Si consiglia pertanto di prostrarre l'incubazione di tutte le piastre di BCSA.

SCHEMA RIASSUNTIVO

Raccolta dei campioni: Sono particolarmente indicati l'aspirato ipofaringeo e l'escreato.

Conservazione: è concessa la conservazione a 4 °C ; è opportuno segnalare le limitazioni di esami eseguiti su campioni ricevuti per posta.

Periodicità: esami con cadenza trimestrale o al momento della riacutizzazione.

Trattamento dell'escreato: è necessaria la fluidificazione da eseguirsi meccanicamente tramite omogenizzatori o con mucolitici quali il ditiotreitolo.

Osservazione microscopica: è consigliata ma ritenuta non indispensabile.

Carica batterica: è sufficiente ma indispensabile l'indicazione semiquantitativa della carica; se la carica batterica è elevata per l'isolamento di alcuni batteri si consiglia la diluizione del campione.

Terreni di coltura: si consiglia l'uso obbligatorio dei seguenti terreni: agar MacConkey, agar cioccolato con bacitracina, agar sale mannite, agar sangue, agar BCSA, e opzionale dei seguenti: agar cetrimide, agar Sabouraud.

Incubazione: per 2 giorni a 35-37 °C; è necessario prolungare di oltre 24 ore l'incubazione dei terreni idonei alla crescita dei Gram-negativi non fermentanti. Nel caso specifico di *B. cepacia* l'incubazione si può protrarre temperatura ambiente per una settimana.

Microrganismi da segnalare: è importante segnalare tutti i microrganismi potenzialmente patogeni per pazienti FC; la segnalazione di microrganismi che rientrano nella definizione di "normale flora" è da effettuarsi a discrezione del microbiologo o su specifiche indicazione cliniche.

Anaerobi: devono essere ricercati su specifica richiesta del clinico e solo su campioni idonei.

Stafilococchi meticillino-resistenti: la meticillino-resistenza deve essere testata su tutti gli Stafilococchi isolati rispettando le indicazioni del NCCLS.

***Staphylococcus aureus* "small colony variant" (SCVs)**

Per il loro isolamento ottimale si richiede l'incubazione dei terreni specifici per almeno 72 ore.

E' necessario eseguire l'antibiogramma con Mueller-Hinton Agar con il 5% di sangue.

La valutazione della meticillino-resistenza deve essere effettuata testando la sensibilità alla cefoxitina (con dischetto da 30 µg su Agar Sangue Columbia) e/o seminando le colonie sospette su un terreno cromogeno specifico per MRSA, che supporta anche la crescita di SCVs .

***Streptococcus pneumoniae*:** è necessario testare la resistenza alla penicillina G da eseguirsi in agar diffusione su Mueller Hinton supplementato con sangue di montone al 5% con un dischetto di oxacillina da 1 µg.

Gram-negativi non-fermentanti: Identificazione: può essere eseguita sia con metodiche manuali che automatizzate; sono consigliati in particolare il sistema ATB expression e le gallerie API (Biomerieux). Per quanto riguarda l'identificazione di *B. cepacia* è consigliabile ripeterla utilizzando due metodi diversi ed eventualmente eseguire tests biochimici supplementari (lisina e ornitina decarbossilasi e liquefazione della gelatina).

Valutazione della chemiosensibilità: Dovrebbe anch'essa essere testata con metodi manuali; è importante differenziare almeno i due morfotipi "rugoso" e "mucoide" di *P. aeruginosa* e testarne la chemiosensibilità separatamente. Per *P. aeruginosa*, *A. xylooxidans*, *S. maltophilia* e *B. cepacia* si consiglia di testare la chemiosensibilità dei seguenti farmaci: netilmicina, tobramicina, gentamicina, amikacina, imipenem, piperacillina, ticarcillina/clavulanato, ceftazidime, aztreonam, cefepime, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina e cotrimossazolo. Su ceppi multiresistenti (resistenti a tutti gli agenti di almeno due delle seguenti classi: β-lattamici, aminoglicosidi, chinolonici), si consiglia di testare anche: meropenem, piperacillina/tazobactam, tetraciclina/cloramfenicolo. Su tali ceppi deve essere valutata anche l'eventuale sinergia fra associazioni di farmaci.

Tipizzazione intraspecifica: è utile per studi di tipo epidemiologico, a causa della notevole variabilità fenotipica di *P. aeruginosa*, *B. cepacia* e *S. aureus* si consiglia di affiancare una metodica classica (sierotipizzazione, tipizzazione piocinica, ecc.), con una che utilizza markers genetici (DNA fingerprints).

Indagini sierologiche: Per il monitoraggio dell'infezione polmonare è necessaria la valutazione della risposta anticorpale nei confronti di *P. aeruginosa* che può essere determinata con le seguenti metodiche: crossed-immunoelectrophoresis (CIE), ELISA.

Micobacteria spp: Devono essere ricercati su specifica richiesta del clinico, anche se una loro eventuale presenza può essere ugualmente segnalata. L'esame batterioscopico può essere eseguito previa colorazione di Ziehl-Neelsen o con auramina e ad esso deve sempre seguire l'esame colturale. E' indispensabile eseguire anche la decontaminazione con acido ossalico.

Mycobacterium chelonae può crescere su BCSA in circa 10 giorni dalla semina preceduto da un caratteristico odore di muffa.

Bibliografia

1. GILLIGAN P.H.

Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis.
Clin Microbiol. Rev. 1991; 4(1); 35-51.

2. RAMSEY B. W., WENTZ K. R., SMITH A. L., RICHARDSON M., WILLIAMS-WARREN J., HEDGES D. L., GIBSON R., REDDING G. J., LENT K. and HARRIS K.

Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. Am. Rev. Respir. Dis. 1991; 144: 331-337.

3. SADEGHI E., MATLOW A., MacLUSKY I., and KARMALI A.

Utility of gram stain in evaluation of sputa from patients with cystic fibrosis.
J. Clin. Microbiol. 1994; 32(1): 54-58

4. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, Roe MH, Vandamme P, Speert D. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretion of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1999; 37: 1004-1007.

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard, M2-A5, vol.13 (24). National Committee for Clinical laboratory Standards, Villanova, Pa.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, M7-A3, vol.13 (25). National Committee for Clinical laboratory Standards, Villanova, Pa.

7. Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Host B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JRW. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. In J Syst Bacteriol 1997; 47: 1188-1200.

8. Manno G, Ugolotti E, Belli MM, Feni ML, Romano L, Luciani M. Use of the E-test to assess synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia* complex from patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 28-34.

9. HØIBY N.

Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. Acta Path. Microbiol. Scand. 1977; Sect. C Suppl.262 .

10. DEI R, CAMPANA S., VARDAR T., RUSSO M., GABBRIELLI M., MARIANELLI L.

Pseudomonas aeruginosa serology in cystic fibrosis: a comparison of methods. Clinical Ecology of Cystic Fibrosis. Escobar H. Baquero F. and Suarez eds. Excerpta Medica. pagg 151-156.

11. OJENIYI B., WOLTZ C., DÖRING G., LAM J. S., ROSDAHL V.T. HØIBY N.
Typing of polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients.
APMIS 1990; 98:423-431.

12. WHITTIER S., HOPFER R. L., KNOWLES M.R. , GILLIGAN P. H.
Improved recovery of Mycobacteria from respiratory secretion of patients with cystic fibrosis.
J. Clin. Microbiol. 1993; 31(4):861-864

