

Medicina di laboratorio

Lez. 3 novembre 2008
Prof.ssa TUFANO

Continuo sepsi:

Vi ricordo dalla lezione precedente la possibilità di ricorrere alla diagnostica tradizionale .

La diagnostica tradizionale è sia manuale che con strumenti che amplificano il segnale di crescita rendendo quindi più rapida la risposta.

Per quanto riguarda la diagnostica manuale abbiamo visto come è necessario la crescita di cultura(uno per anaerobi,uno per aerobi)però sono necessarie culture giornaliere, evitando la contaminazione.

È pur vero che l'esempio colturale è l'unico che ci permette di avere il microorganismo in coltura pura e fare poi dei test di sensibilità ad antibiotici così da poter individuare la terapia.

Abbiamo anche detto che c'è la possibilità di utilizzare metodi automatici che amplificano il segnale di crescita(non 10gg come per il primo metodo ma 4-5gg ,ossia una risposta più rapida).

L' amplificazione viene fatta con metodi colorimetrici e fluorimetrici.

Abbiamo detto quali sono le criticità dell' esame colturale(tab 3),inteso come :

- modalità di prelievo
- numero e timing dei campioni
- precedente terapia antibiotica
- quantità di sangue da utilizzare
- terreni di coltura
- ecc

Stavamo evidenziando la possibilità di intervenire con indagini innovative come il SEPTI FAST.

Il SEPTI FAST è un'indagine molecolare che si basa sull'estrazione del dna dal campione,poi amplificazione con PCR evidenziando il prodotto dei campioni.

Tutto ciò comporta grandi vantaggi come ad esempio(tab 9):

-Tempi di diagnosi: sono molto brevi circa 6 h. Questo è un grande vantaggio perchè nei reparti a rischio quando il paziente è grave è necessario ricorrere a terapia empirica "ragionata".

Cio significa conoscere il microorganismo che causa l' infezione ed individuare quello che circola in quel reparto. È importante perciò conoscere l' epidemiologia di reparto e delle resistenze in base alle quali basiamo la terapia empirica.

Una volta ottenuta questa indagine riconosciamo il microorganismo anche con l' emocoltura .

Esiste la possibilità di confrontare i diversi metodi in base ad alcuni parametri.

(tab 6)

Il TAT è il tempo di attraversamento ossia il tempo che intercorre tra l' arrivo del prelievo in laboratorio e la risposta del laboratorio. Per cui l' emocoltura con metodi automatici ci da risultati entro 3-4gg mentre nel septi fast entro 6 h siamo a conoscenza dei risultati.

Il Target : nell'emocoltura dovendo evidenziare la crescita batterica , abbiamo la necessità che i patogeni siano vivi. Nel Septi fast invece anche i patogeni non vitali o il dna libero prodotto dalla lisi batterica puo esserne target.

Con l' Antibiogramma nel septi fast l' unica cosa che possiamo evidenziare è la resistenza alla Meticillina,che si rileva con l' individuazione del gene mec-A. Questo gene espresso in ceppi di

Stafilococco Aureus, St.Epidermidis, St. coagulasi positivi codifica appunto per la meticillina resisteza. Questi ceppi fanno parte dei cosiddetti microorganismi Alet "sentinella" che sono presenti nei reparti di terapia intensiva.

In entrambe le metodiche la sensibilità è buona e i miceti possono essere identificati.

Nel sepsi fast a differenza delle emocoltura i pazienti devono essere selezionati soprattutto in relazione ai costi elevati di questa metodica(circa 200€).è necessario selezionare i pazienti piu gravi che hanno bisogno di una rapida terapia, vuoi perchè hanno risposto alla terapia ma poi hanno sviluppato resistenza a questa o perchè poi l' infezione si è ripresentata.

Per quanto riguarda il personale esso nel sepsi fast deve essere "ad hoc" esperto in biologia molecolare e pratico con le apparecchiature.

I vantaggi del sepsi fast sono(tab 9):

- ◆ riferiti a campioni di sangue:1,5mL (nell' emocoltura degli adulti sono necessari 20mL,nei bambini 5mL).
- ◆ Riduzione dei tempi di rilevazione (6 h)fermo restando che emocoltura deve essere attuata per poi valutare la terapia trasformando la terapia da ragionata a mirata.
- ◆ Maggiore sensibilità: più risultati positivi rispetto a metodi culturali.
- ◆ Maggiore specificità ci sono meno contaminati
- ◆ risultati in grado di orientare la terapia
- ◆ migliore identificazione di polinfezioni. A volte ci troviamo di fronte a più organismi infettanti soprattutto negli immunodepressi.
- ◆ Percentuale di positività più alte per infezioni fungine.
- ◆ Nessuna influenza da parte di antibiotici nei pazienti trattati (anche se il paziente ha iniziato la terapia antibiotica essa non inficia il risultato. Nell'emocoltura invece dobbiamo fare il prelievo prima del successivo ciclo di terapia).
- ◆ La cosa importante è che la diagnosi sia clinicamente utile e perciò rapida.
- ◆ Vi sono biomarcatori umorali che ci permettono di fare diagnosi di sepsi in associazione all' isolamento e all' identificazione del microorganismo. Essi sono:
- ◆ Procalcitonina (PCT) :essa aumenta dopo 3-4 h dall' inizio del processo setticemico,ha un picco dopo 6 h,un plateau dopo 24 h e un'emivita tra 25-30 h,viene poi degradata da proteasi specifiche ed eliminata per via renale. Dati sperimentali su questo marcatore hanno evidenziato come i livelli di Pct si modifichino in corso del processo setticemico (classificazione di Bone) questo dosaggio ci puo anche dire se la terapia è efficace o meno perchè monitorando la Pct se i livelli si riducono nel tempo allora la terapia sarà efficace.
- ◆ PCR (proteina c- reattiva) :proteina di fase acuta, epatica. Viene rilasciata su stimolo di IL6,IL8 . Aumenta dopo 4-6 h, emivita 28 h. non aumenta in corsi di infezioni virali per cui ci permette di evidenziare le infezioni batteriche da quelle virali.negli individui sani I valori normali sono tra 0.2 -0.4 mg/dL .I valori di PCR sono maggiori di 8mg/dL sono predittivi di sepsi (sensibilità di 94.3% ,specificità di 87.3%).Da questi dati vediamo che I pazienti con SIRS ,cioè con risposta aspecifica che può non essere associata ad infezioni I valori normali sono ,come si evince dalla tabella compresi tra 0.95; 3.45 ;2. mentre nei pazienti con sepsi I valori sono compresi tra 18.4; 17.3 ; 19.9 . La PCR è un marcatore predittivo che consente di valutare l'entità dell'infezione.
- ◆ Trem 1 : non è altro che un recettore sulle cellule linfoidi dei focolai infiammatori ,che

- ◆ aumenta quando c'è un processo infettivo e infiammatorio.
- ◆ TNF
- ◆ IL1,IL2,IL6,IL8
- ◆ C3a : interviene nella SIS e induce vasodilatazione e chemiotassi.

INFEZIONI DA CATETERI VASCOLARI :

Tra I dispositivi impiantabili che si usano in ambito ospedaliero ,i cateteri vascolari sono I più utilizzati . Tant' è vero che si è visto che tra il 30-50% di pazienti ospedalizzati necessita di cateteri vascolari. Le utilizziamo per varie situazioni da situazioni critiche a meno critiche.

Le situazioni critiche come il monitoraggio delle funzioni vitali in terapia intensiva,chemioterapia,terapia emodialisi,trapianti di midollo,nutrizione parenterale.

Come vedete è un grande uso soprattutto nei reparti critici.

Questi cateteri devono essere costituiti da materiale biocompatibile che deve evitare il rigetto, quindi evitare I fenomeni immunitari,allergici. Devono essere costituiti da materiale non tossico. Poichè sono posizionati in circolo devono essere costituiti da materiale non trombogeno . Perciò si sono ricercati materiali adatti . Oggi ci sono cateteri costituiti da polimeri soprattutto polietilene , poliuretano, teflon , polipropilene, silicone, polimetiltetracrilato , quest ultimo è quello più usato. Sono I sostituenti chimici più utilizzati perchè più biocompatibili.

Nonostante I processi medici e tecnici fatti su questi dispositivi ,c'è il problema di infezioni del materiale ,soprattutto per cateteri vascolari . Gli aspetti più gravi di questa infezione ,di tipo cronico ,è che è difficilmente eradicabile.

Alcuni cateteri impiantati chirurgicamente (di difficile risoluzione), protesi e valvole cardiache , nel momento in cui si costituisce una popolazione su queste superfici, non è possibile usare antibiotici perchè non funzionano ,non sono sensibili ad antibiotico terapia , per cui è necessario ricorrere alla rimozione dell'impianto ed il paziente necessita di un secondo intervento ,che in genere è molto costoso.

Come soluzione oggi si tende ad inserire nel materiale polimerico utilizzato per I dispositivi, antibiotici a largo spettro e a lento rilascio perchè il problema fondamentale è la colonizzazione batterica ,perchè nel momento in cui si verifica la colonizzazione batterica,la crescita sarà particolare per cui è difficile eradicare I batteri.

Un dato viene dagli STATI UNITI : negli USA si registrano oltre 200000 casi di sepsi ospedaliera di sepsi ospedaliera ,nosocomiale, all'anno.

Il 90% delle sepsi è correlata all'impianto di dispositivi intravascolari,il 70% di questa percentuale è correlato all'inserimento di cateteri venosi centrali .

Negli USA si impiantano 5 milioni di cateteri venosi centrali l'anno e circa 150 milioni di cateteri vascolari periferici quindi l'impatto è notevole.

L'impianto di cateteri comporta un prolungamento dei ricoveri ospedalieri ,perchè la situazione di base del processo che ha richiesto l'inserimento del catetere si aggiunge al processo infettivo,che comporta a sua volta un aumento dei costi di degenza e un aumento della morbilità e della mortalità dei pazienti .

L'infezioni da cateteri vascolari si instaura in seguito a rottura di equilibrio dinamico,dove intervengono l'ospite ,il catetere (composizione e condizione del catetere)ed il microorganismo(caratteristiche della specie batterica).

FATTORI LEGATI ALL'OSPITE:

Quando si impianta un catetere, esso è considerato come corpo estraneo e quindi si forma un film proteico sulla superficie interna o esterna del catetere legata da proteine dell'ospite (fibrina, trombina, fibronectina) che favoriscono l'adesione piastrinica e la sovrainfezione batterica. La competenza immunologica del paziente immunocompromesso è importante, però anche nel paziente immunocompetente si stabilisce con una certa frequenza, perché determina il superamento della barriera cutanea, così dalla cute il microorganismo può penetrare nei vasi. Inoltre l'applicazione del catetere (come corpo estraneo) determinando riduzione dell'immunità aspecifica dell'ospite come soprattutto la fagocitosi e il meccanismo di killing cellulare per cui viene ridotto il meccanismo di difesa aspecifica.

FATTORI LEGATI AL CATETERE:

Le infezioni da cateteri e quindi la colonizzazione del catetere è favorita dal materiale con elevata carica elettrica, perché questa favorisce le interazioni tra microorganismo e superficie del catetere. Altra condizione favorente l'adesione del microorganismo è l'idrofobicità del catetere. Il catetere non deve essere trombogenico e ciò è in relazione al materiale che lo costituisce, infatti i cateteri in teflon e silicone sono meno infettati.

FATTORI LEGATI AL MICROORGANISMO:

C'è da considerare un problema biologico molto importante, perché i microorganismi che infettano il catetere e soprattutto la superficie interna, il lume, di questo con determinate caratteristiche biologiche, che sono in grado di sintetizzare lo slime, il glicocalice (materiale esopolisaccaridico circondante la parete batterica), un biofilm microbico che è molto adesivo. Il batterio, una volta adeso al catetere, sintetizza lo slime, continua a moltiplicarsi formando delle microcolonie sul materiale protesico, che invadono la superficie del catetere ed a questo punto si realizza un tipo di crescita detta "a BIOFILM". Il Biofilm può invadere tutta la superficie del catetere per cui sarà necessaria la rimozione del catetere o della valvola.

Altri fattori favorenti la colonizzazione batterica sono legati al sito di inoculo del catetere, ad es. I cateteri inseriti in Giugulare e nella Femorale sono più soggetti a colonizzazione da parte di microorganismi, tant'è vero che il CDC di Atlanta indica migliore la cateterizzazione in Succlavia. Inoltre i cateteri a lunga permanenza favoriscono la colonizzazione batterica.

Altro fattore da tenere sotto controllo sono i liquidi di infusione, che si contaminano facilmente. Esistono infezioni da catetere, causate da microorganismi rari come il micete MALASSEZIA FURFUR, che colonizza normalmente la cute. Esso non sintetizza acidi grassi, ma li prende dall'esterno, ad es. In laboratorio vengono utilizzati come sorgente esogena di grassi terreni di coltura contenenti olio di oliva; non a caso la MALASSEZIA FURFUR colonizza distretti cutanei ricchi di sebo, come il dorso, la cute toracica a livello sternale ed è responsabile della DERMATITE SEBORROICA. È stata inoltre associata a Psoriasi e Follicolite.

Dalla cute il micete può raggiungere cateteri e liquidi di infusione, quando si tratta di infusioni lipidiche.

Punto critico della applicazione di cateteri è la sterilità. Ciò prevede un'ottima formazione del personale sanitario e parasanitario. Deve essere evitata la contaminazione del giunto, del raccordo del catetere. Nel momento in cui si è avuta la contaminazione e la trasmissione del microorganismo sul catetere, esso si moltiplica e va in circolo e si realizza la sepsi correlata a catetere vascolare.

Fattori di rischio legati ad infezioni da catetere: (slide 5 e 6) .

- Fattori legati all'ospite: le età estreme sono quelle più a rischio (meno di un anno e più di 60 anni), situazioni di fondo dei soggetti come neutropenie e terapia immunosoppressiva, lesioni cutanee, malattie gravi debilitanti, presenza di un focolaio infettivo in un altro distretto corporeo al momento dell'impianto del catetere . Sono forme di sepsi secondaria ,dal focolaio primario I microorganismi passano in circolo e determinano sepsi secondaria e, qualora ci sia un catetere ,infezione della punta del catetere (porzione del catetere che raggiunge I vasi).

- Fattori di rischio legati al catetere: maggiore permanenza di CVC maggiore rischio di infezioni. Se la disinfezione di cute non è stata fatta in maniera adeguata, l'impianto del catetere può attenuare direttamente o indirettamente l'immunità locale dell'ospite, riducendo il feeling intracellulare (questo accade soprattutto per I cateteri a base di polimetiltetracrilato) .

L'infezione da catetere intravascolare può instaurarsi per:

- ◆ -via intraperiluminare dalla cute alla superficie del catetere migrazione attraverso il sito di inserzione del catetere.

- ◆ -via intraluminare dal giunto alla superficie interna del catetere

- ◆ -contaminazione dei liquidi di infusione

- ◆ -via ematogena da un focolaio setticemico per via ematica raggiunge la punta del catetere .

Di queste quattro possibilità ,le prime due sono più frequentemente responsabili di oltre il 95% delle infezioni.

(SLIDE 8)

Qui vedete come viene inserito il catetere attraverso la cute . Questo è il raccordo del catetere dove vanno le mani dell'operatore ,per cui è un sito molto importante per l'infezione .

Il catetere attraversa come un tunnel la cute ,il sottocute e la punta del catetere raggiunge il vaso.

Nel momento in cui raggiunge il vaso ,si forma il film proteico derivante da proteine dell'ospite che ricopre la punta del catetere e ne copre in cm ed è in questa sede che si ha l'infezione.

L'infezione che si può avere può provenire o dalle mani dell'operatore per cui noi parliamo di infezione del giunto o per incursione della cute circostante la sede di inoculo del catetere il che testimonia la disinfezione della cute stessa per evitare che i germi vengono portati all'interno oppure per via ematogena da un focolaio distante.

I FATTORI CHE PROMUOVONO LA COLONIZZAZIONE MICROBICA sono:

- catetere

- ospite
- microorganismi

1) catetere: oltre alla composizione chimica e a caratteristiche di superficie come la carica elettrica, l'idrofobicità, il materiale, ma è importante anche che la superficie del catetere sia liscia.

Allorquando si evidenzia che le fratture del catetere formino nicchie favorevoli alla colonizzazione e la crescita batterica (slide 10). in particolare per *Stafilococco Epidermidis* (formazioni a grappolo tipiche).

2) ospite: il film proteico, evidente già poche ore dopo l'inserimento del catetere, costituito da fibronectina, fibrine e trombina, copre la superficie interna del catetere venoso centrale favorendo la colonizzazione dei microorganismi (slide 11).

3) microorganismo: vediamo cosa succede quando si impianta un microorganismo sul catetere: noi riconosciamo tre tappe fondamentali:

- ◆ Adesione: che in prima istanza è reversibile ma poi diviene, col passare del tempo, irreversibile.
- ◆ Colonizzazione: con la sintesi di esopolisaccaridi in grosse quantità.
- ◆ Formazione di film microbico maturo.

LA COLONIZZAZIONE E IL BIOFILM:

(slide 14)

Noi ritroviamo su queste superfici, più o meno grandi, immerse nella matrice polisaccaridica i microorganismi con crescita a Biofilm, ed i Biofilm sono responsabili di gran parte delle infezioni nosocomiali.

Addirittura il CDC stima che siano causa del 65% delle infezioni ospedaliere diagnosticate nei paesi avanzati. Solitamente si tratta di infezioni croniche, che oltre al dispositivo (catetere), interessano diversi apparati.

Ad esempio per l'Apparato Respiratorio, la Fibrosi Cistica, in cui è coinvolto il ceppo di *Pseudomonas Aeruginosa*, che produce una grossa quantità di glicocalice.

Nelle COPD (Broncopolmoniti cronico ostruttive), oppure nelle VAP (Polmonite associate a ventilatore).

Ma anche nelle faringiti, rinosinuiti, otiti, che sono infezioni croniche, in cui è possibile rilevare la presenza di biofilm.

Oppure in urologia, le prostatiti croniche causate da microorganismi produttori di Biofilm, le uretriti e le cistiti.

Nelle endocarditi. Ed in ultimo le infezioni associate ai dispositivi di cui stiamo parlando oggi.

Vedete nella slide le tappe della formazione del Biofilm (slide 16).

Quando i microorganismi sono liberi nel torrente circolatorio, si parla di forme PLANCTONICHE, forme libere che sintetizzano poco glicocalice.

Quando una di queste forme inizia ad aderire, è l'adesione stessa a stimolare la sintesi di alcuni geni che codificano per la produzione di glicocalice, di conseguenza perciò quando il batterio

aderisce forma una maggiore quantità di glicocalice.

Il microorganismo sarà circondato da una matrice di glicocalice.

Alla fase dell' adesione segue pertanto la fase della colonizzazione in cui si assiste alla formazione di microcolonie ed intorno a queste c'è una grossa quantità di materiale amorfo. A mano a mano che la colonia si accresce e produce sempre più matrice, che arriva ad aderire e circondare la superficie del catetere , le microcolonie invadono la superficie del catetere formando lesioni che arrivano ad occupare addirittura alcuni cm del dispositivo.

(SLIDE 17)

I BIOFILM sono difficili da eradicare per due motivi:

- 1) il microorganismo in forma planctonica una volta che ha interagito con il sistema immunitario dell' ospite indurrà questo a produrre anticorpi per gli Ag del microorganismo. Gli antibiotici non riescono a raggiungere il sito bersaglio ed uccidere il batterio perchè questi sono mascherati dal biofilm. Inoltre i PMN anche se attivi, per motivi sterici non riescono ad inglobare i microorganismi ormai adesi al biofilm per cui non si riesce a fare fagocitosi.
- 2) Quando utilizziamo un isolamento in vitro del microorganismo responsabile, esso è in forma planctonica con poco slime per cui al test di sensibilità in vitro, il microorganismo risulta sensibile ad un determinato antibiotico. Quando però utilizziamo in vivo l'antibiotico esso non funziona per una serie di motivi ,legati al glicocalice, perchè non ci arriva o perchè in vivo l'antibiotico non funziona perchè il biofilm non permette agli antibiotici di penetrare.

LE RESISTENZE BATTERICHE:

Distinguiamo due tipi di resistenze batteriche : intrinseche (Genotipiche:Assolute o Acquisite) ed estrinseche(Fenotipiche).

Resistenze intrinseche:

Esistono famiglie batteriche che sono intrinsecamente resistenti ad antibiotici e non diventeranno mai sensibili.

Le resistenze genetiche sono Assolute ,ad es. nel caso in cui ci sia mancanza di penetrazione delle penicilline e delle beta lattamine nei batteri (ad es. *Pseudomonas Aeruginosa*). normalmente per alcuni batteri le betalattamine passano attraverso le porine (il cui cut off è 700kDa) all'interno del microorganismo . *Pseudomonas Aeruginosa* è un Gram negativo ed ha porine più strette per cui le penicilline non riescono a passare. Questi ceppi saranno perciò sempre resistenti alle beta lattamine. Altro esempio di resistenza sono i Mycoplasmi che presentano resistenza alle beta lattamine visto che non hanno la parete cellulare.

Esiste poi una resistenza Acquisita che si realizza con due modalità .

La prima attraverso la mutazione e la selezione di ceppi mutanti resistenti ad alcuni antibiotici. L' antibiotico rappresenta la pressione selettiva per la selezione di mutanti,per cui l'antibiotico agisce su ceppi sensibili ma non sui mutanti resistenti.

La seconda modalità : Dato che i mutanti in una popolazione batterica sono molto rari (pari a 10 alla sesta) ,cause più frequenti di resistenza sono i Plasmidi (eventi genetici extra cromosomici che si replicano autonomamente e più frequentemente). Essi si trasferiscono da un batterio ad un altro e alcuni cambiando ospite acquistano caratteri di resistenza attraverso un meccanismo di passaggio di geni o anche di un solo gene,i così detti Trasposoni “jumping iss”,gene che passa da una parte

all'altra.

Tutto ciò rende i Plasmidi capaci di modifiche . Queste sono le modalità che causano maggiori resistenze.

I plasmidi codificano infatti per enzimi in grado di resistere ad antibiotici ,come ad es. la produzione di beta lattamasi , o di penicillinasi .

Altri esempi sono rappresentati nei Gram positivi di enzimi modificanti gli Aminoglicosidi,o per ceppi di P.Aeruginosa di carbapenemasi ,in grado di inibire i carbapenemi.

Resistenze Fenotipiche:

Sono le resistenze che ci interessano più da vicino. La resistenza agli antibiotici non è legata a marcatori genetici ,ma a situazioni ambientali che non consentono all'antibiotico di funzionare .

Ad es. la Salmonella in vitro risulta sensibile agli Aminoglicosidi in vivo però questo antibiotico non funziona ,perchè l'ambiente gastroenterico è povero di ossigeno e l'aminoglicoside non funziona in anerobiosi.

Un altro meccanismo di resistenza è il basso pH , tipico delle raccolte ascessuali ,che inattiva alcuni antibiotici.in questa situazione ,perchè un antibiotico possa funzionare,sarà doveroso drenare l'ascesso,così da ricostituire il pH .

(slide 21)Un altro meccanismo che rende inattivo l'antibiotico è il lento tempo di replicazione del batterio ,soprattutto per quanto riguarda la resistenza alle beta lattamine e gli agenti attivi sulla sintesi della parete cellulare.

Infine per batteri intracellulari come Legionella e Chlamidia ,la loro localizzazione li rende resistenti alle beta lattamine(visto che questi antibiotici non penetrano all'interno della cellula),ma sensibili ai macrolidi.

P.S. La lezione va integrata con le slide della professoressa.

F . C.

