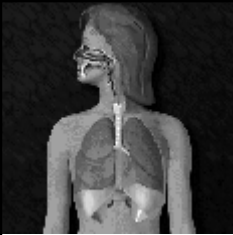


Le infezioni croniche del tratto respiratorio inferiore

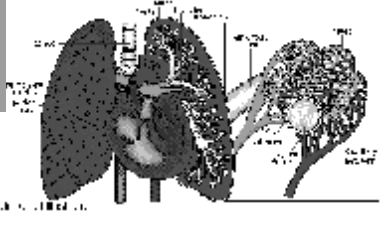


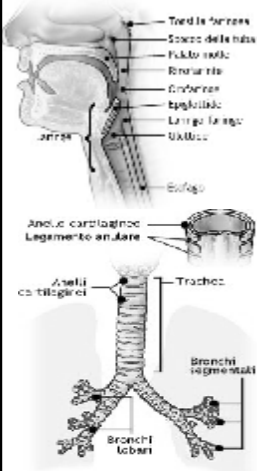


L'apparato respiratorio è costituito da:

- Vie aeree superiori → naso, faringe (che è costituita da rino-faringe e oro-faringe)
- Vie aeree inferiori → laringe, trachea, bronchi e tutte le loro successive diramazioni.

- **Polmoni** in cui avviene lo scambio dei gas.

Si definisce polmonite l'insieme di tutti i processi infettivi acuti a sede polmonare caratterizzati da essudazione endoalveolare, peribronchiale ed interstiziale, aventi diversa eziologia (batterica, virale o similvirale), qualunque sia la loro estensione.



Distretti non sterili e flora batterica residente APPARATO RESPIRATORIO

a) Cavità orale, orofaringe e rinofaringe

Stafilococchi (*S. aureus*, *S. epidermidis*) e Micrococchi

Streptococchi (viridanti, Enterococchi, Pneumococchi)

Cocchi Gram-positivi anaerobi

Corinebatteri, Lattobacilli

Neisserie non patogene

Cocchi Gram-negativi anaerobi

Enterobatteri (*E. coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp)

Emofili

Bastoncelli Gram negativi anaerobi

Miceti (*Candida albicans*)

b) Cavità nasale

Stafilococchi (*S. aureus*, *S. epidermidis*)

Streptococchi (viridanti e Pneumococchi)

Emofili

Corinebatteri

Distretti abitualmente sterili

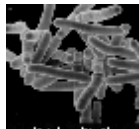
a) Laringe

b) Trachea

c) Bronchi

d) Alveoli

e) Cavità sinusali



Tubercolosi

MICOBATTERI TUBERCOLARI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Mycobacterium tuberculosis: agente etiologico tubercolosi umana

Mycobacterium africanum: variante di *M. T.* frequentemente isolato in Africa

Mycobacterium bovis: agente etiologico della tubercolosi bovina, trasmissibile all'uomo per via alimentare

Micobatteriosi

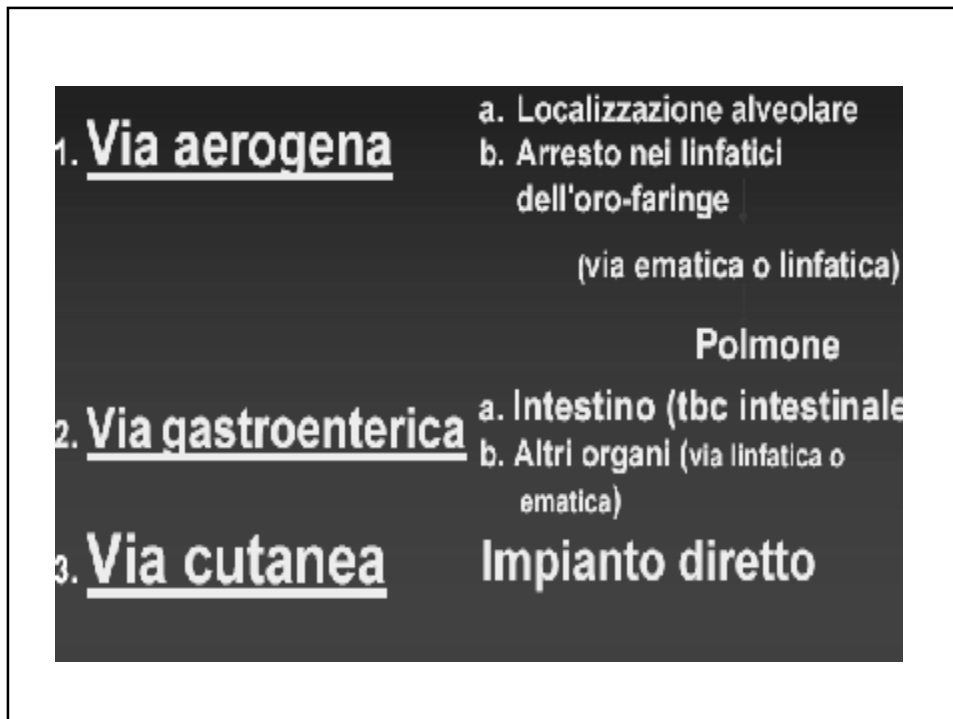
affezioni causate da micobatteri atipici o non tubercolari (MOTT)

MICOBATTERI NON TUBERCOLARI

MYCOBACTERIUM OTHER THAN TUBERCULOSIS (MOTT)

M. scrofulaceum complex, *M. avium* complex, *M. fortuitum*

In genere contaminati ambientali o parassiti di alcune specie animali:
occasionalmente possono infettare l'uomo (immunodepressione,
denutrizione, presenza di traumi etc)

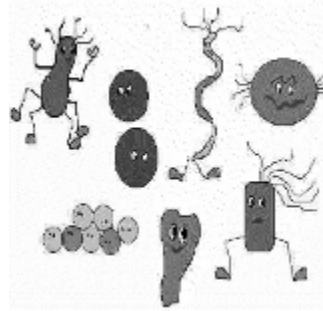


<u>TIPICA</u>	<u>ATIPICA</u>
Sviluppo improvviso	Sviluppo progressivo
Tosse produttiva	Tosse secca
Espettorato purulento con PMN e patogeni	Espettorato scarso
Dolore toracico	Brucciore retro-sternale
Febbre elevata	Scarsa febbre
Leucocitosi	Non leucocitosi

origine batterica con flogosi endoalveolare, con raccolta di essudati ricchi di cellule infiammatorie che riempiono gli spazi alveolari stessi.

sede prevalentemente interstiziale, pericapillare alveolare e, scarsa partecipazione dell'epitelio alveolare, gli alveoli rimangono ventilati, manca l'ipossiemia.

Il ruolo del Laboratorio di Microbiologia



IL TEMPO E' IMPORTANTE...

**STRETTA COLLABORAZIONE
TRA CLINICI E MICROBIOLOGI
SCAMBIO DI INFORMAZIONI
ANTICIPAZIONE DEI RISULTATI**



LABORATORIO

indicazioni circa:

- campioni da raccogliere**
- siti da campionare**
- sistemi di prelievo**
- metodi di trasporto**

•conoscenza dei metodi



MODALITA' DI PRELIEVO, CONSERVAZIONE ED INVIO DEI CAMPIONI PER RICERCHE MICROBIOLOGICHE

La ricerca dei materiali deve avvenire prima dell' inizio della terapia antibiotica. La raccolta deve essere effettuata sterilmente nella sede anatomica del processo morboso. Occorre evitare ogni contaminazione esogena o endogena del campione. Il trasporto dei campioni in laboratorio deve avvenire in tempi e condizioni che non alterino le caratteristiche batteriologiche del materiale patologico. Il campione deve essere accompagnato dalla scheda di richiesta compilata in ogni sua parte

Dotarsi di sistemi necessari per un rapido e preciso riconoscimento

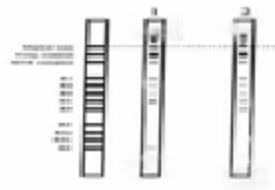
Colturali



Immunologici



Molecolari



MODALITA' DI CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI BIOLOGICI NELLE ORE DI CHIUSURA DEL LABORATORIO

- **Sangue:** conservare i flaconi a temperatura ambiente per non più di 12 ore.
- **Punte di cateteri vascolari:** il contenitore sterile con il catetere può essere conservato in frigorifero a +4°C per non più di 12 ore.
- **Liquido cefalo-rachidiano:** portare immediatamente il liquor in urgenza; l'esame viene eseguito dal Medico di guardia.
- **Urine:** tutti i campioni possono essere conservati in frigorifero a +4°C per non più di 24 ore.
- **Feci:** in frigorifero per il minor tempo possibile; il tampone con terreno di trasporto può essere conservato a temperatura ambiente per non più di 24 ore.
- **Broncoaspirato ed espettorato:** solamente per la ricerca dei Micobatteri si possono conservare i campioni a +4°C per 24 ore.
- **Materiali raccolti con tamponi con terreno di trasporto:** possono essere conservati a temperatura ambiente per 24 ore.
- **Essudati e liquidi di drenaggio:** se raccolti in contenitori per anaerobi o in tampone con terreno di trasporto, possono essere conservati a temperatura ambiente per 24 ore; se raccolti in provette o altri recipienti sterili, devono, invece, essere inviati immediatamente in Microbiologia, solo durante gli orari di apertura specificati.



Gli esami importanti da effettuare per sospetta TBC sono:

- radiografia del torace in due proiezioni ed, in casi dubbi, TAC polmonare
- Tine test con controllo della positività a 24, 48 e 72 ore

Tubercolosi polmonare primaria, Tubercolosi miliare: extrapolmonare, Peritonite tubercolare, Tubercolosi epatica, Meningite tubercolare, Pericardite tubercolare, Tubercolosi ossea, Tubercolosi cutanea



La radiografia toracica qui riprodotta mostra la calcificazione del tessuto polmonare prodotta dalla tubercolosi, una malattia di origine batterica causata dal bacillo *Mycobacterium tuberculosis*. Nella maggior parte dei casi la malattia non è sintomatica, ma rimane latente, controllata dal sistema immunitario. Gli attuali metodi terapeutici hanno drasticamente ridotto l'incidenza dello stadio critico di questa patologia, che comporta gravi difficoltà respiratorie e rischio di morte.

Reazione di Mantoux: accertamento immunità cellulo-mediata, specifica nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis*

Test tubercolinico

Indicazione

- Sogg. con segni clinici e radiografici per tbc
- Sogg. che denuncino contatti recenti con ammalati
- Immigrati da zone ad alta endemia
- Lavoratori e degenti a lungo termine di prigioni e ospedale

Esecuzione del tine test

Tubercolina: proteine micobatteriche purificate -PPD (purified protein derivative)

Iniezione intradermica

Esito negativo: il soggetto non ha avuto precedenti contatti con *M. tuberculosis*

Esito positivo: 24-48 h dal trattamento: reazione infiammatoria: presenza di una papula eritematosa

La reazione risulta positiva anche nei soggetti infetti da *M. bovis* e in una buona percentuale di soggetti infetti da *M. non tubercolari*, nei quali, però la reazione risulta più intensa se viene utilizzata una tubercolina specifica

Test-tine: reazione negativa. L'indurazione di 2 mm viene considerata negativa

Reazione dubbia -positiva. L'indurazione tra 2-4 mm. Le papule si toccano e hanno una depressione centrale

Reazione positiva: >5 mm. La placca è sommontata da vescicole nei punti di inoculazione

B

Diagnosi rapida ?



Diagnosi:

- 1) Valutazione clinica
- 2) Valutazione radiologica
- 3) Esami di laboratorio

Esami di laboratorio:

- Emato-chimici
- Microscopia
- Colture
- Ricerca di antigeni
- Sonde di acidi nucleici



esame dell'espettorato, che deve essere raccolto al mattino in contenitori sterili; normalmente si raccolgono 3 campioni in 3 giorni successivi; se vi è difficoltà al prelievo si deve ricorrere a **broncoscopia**.

- in caso di pleurite il liquido pleurico raccolto tramite **toracentesi** (puntura toracica) può essere analizzato ma è di difficile interpretazione.
- escreato o il liquido di lavaggio gastrico. E' necessario raccogliere più campioni in quanto il numero di bacilli escreti può essere esiguo.
- esame microscopico diretto reperto di bacilli acido-alcool resistenti (valore presuntivo)
- esami batteriologici

I campioni devono pervenire al laboratorio meglio se entro 30 minuti dalla raccolta e in ogni caso non oltre le 24 ore se refrigerati. I campioni vengono innanzitutto processati previa sedimentazione per centrifugazione.

Primo passo nella diagnosi laboratoristica consiste nello allestimento del preparato microscopico: strisci colorati con metodiche che evidenzino l'alcool-acido resistenza tipica dei micobatteri come la metodica di Ziehl-Neelsen.

La sensibilità dell'esame microscopico è purtroppo bassa e richiede perché sia positiva una carica di 10.000 bacilli/ml, dato che sottolinea, se considerato da una diversa angolazione, la grande importanza di una eventuale positività e che giustifica il fatto che viene considerato altamente sospetto il riscontro anche di un solo batterio. La diagnosi definitiva si ottiene però tramite l'esame colturale, ostacolato dall'esperante lentezza di crescita dei micobatteri.

la decontaminazione dei campioni

Primo passo è la liquefazione e decontaminazione del campione, che solitamente viene eseguita utilizzando N-acetilcisteina come mucolitico in soluzione con idrossido di sodio all'1%: quest'ultimo garantisce l'uccisione di tutti gli altri microorganismi, mentre i micobatteri risultano protetti grazie alla particolare ricchezza in acidi grassi della parete cellulare.

Le colorazioni in Microbiologia

Perché colorare ?

La cellula batterica è trasparente, il contrasto tra cellula batterica ed ambiente circostante è insufficiente. I coloranti debbono consentire:

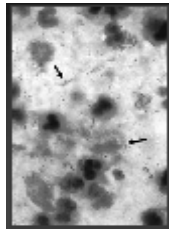
- forte contrasto tra i microrganismi ed il fondo
- differenziazione di vari tipi morfologici (forma, organizzazione, colorazione Gram)
- evidenziazione di alcune strutture (flagelli, capsule, endospore)

I coloranti constano di ioni (positivi o negativi). Al riguardo, essi possono essere suddivisi in:

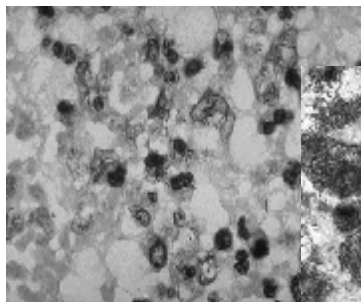
- coloranti basici (blu di metilene, fucsina basica, violetto di genziana, cristalvioletto, tionina): Carica positiva → Affinità per le strutture acide (superficie cellulare, proteine, acidi nucleici) → Colorazione diretta
- coloranti acidi (eosina, negrosina, rosso Congo): Carica negativa Affinità per le strutture basiche, si depositano attorno al microrganismo → Colorazione indiretta o negativa

la diagnostica tradizionale

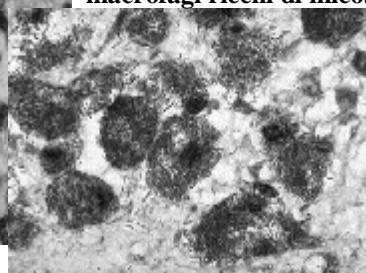
esame microscopico
 esame colturale
 identificazione
 antibiogramma



- *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (o *M. bovis*)
- Bacilli alcol-acido resistenti (Ziehl-Nielsen)
- Crescita lenta in stretta aerobiosi (terreni di coltura arricchiti)



***Mycobacterium avium* complex (MAC):**
 macrofagi ricchi di micobatteri

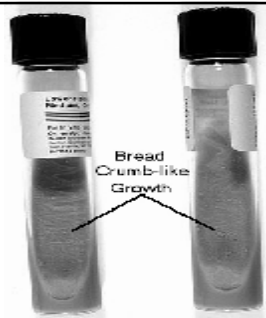


semina dei terreni
 incubazione
 lettura settimanale
 lettura finale
 refertazione

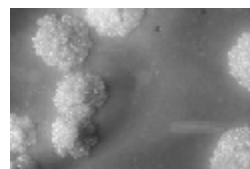
- terreni solidi
 - a base di uovo
 - a base di agar
 - selettivi
- terreni liquidi



terreno Redox



Lowenstein Jensen Media



Crescono nel terreno liquido di Kirchner formando piccoli fiocchi o intorbidamento uniforme; i sali di tetrazolio presenti nel terreno vengono ridotti a formazano dai micobatteri in crescita; il formazano, rosa-violetto ed insolubile, si fissa alla superficie delle colonie permettendone il riconoscimento

Le specie maggiormente patogene necessitano di terreni arricchiti con sostanze quali: uova, glicerina, fecola di patata
 I terreni principali per l'isolamento dei micobatteri sono:
 a) Terreno di Lowenstein-Jensen (asparagina, uovo, fecola, glicerolo e verde malachite che inibisce la flora concomitante)
 b) Terreno di Petraghani rispetto al terreno precedente, presenta estratto pancreatico e maggiore quantità di verde malachite

TIPIZZAZIONE

Metodi fenotipici

- **biotipizzazione: profilo biochimico**
- **antibiogramma: pattern di resistenza**
- **sierotipizzazione: caratteri antigenici**
- **fagotipizzazione: sensibilità ai batteriofagi**
- **Multilocus Enzyme**

Metodi genotipici

- **analisi del DNA plasmidico**
- **analisi di Restrizione del DNA cromosomico (REA)**
- **Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**
- **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**
- **Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)**
- **Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)**
- **Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC)**
- **Ribotyping**
- **sequenziamento dell'acido nucleico**

identificazione tradizionale, test biochimici

- accumulo di niacina
- riduzione dei nitrati
- catalasi
 - quantitativa
 - termoresistente
- idrolisi del Tween 80
- ureasi
- arilsolfatasi
- riduzione del tellurito
- velocità di crescita
- aspetto delle colonie
 - rugose lisce
 - fotocromogene
 - scotocromogene
 - non pigmentate
- crescita a varie temperature
- test di inibizione selettiva

metodi di identificazione alternativi

- DNA probe
- HPLC degli acidi micolici
- sequenziamento genico
 - 16S rDNA
 - *SOD*
 - *HSP65*

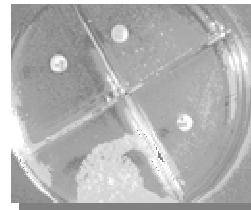
le fasi della *Polymerase Chain Reaction*

- pretrattamento del materiale e liberazione dell'acido nucleico
 - fluidificazione ed eventuale decontaminazione
 - lavaggio
 - lisi delle cellule
- amplificazione dell'acido nucleico
- rilevamento dell'amplificato



antibiogramma

- l'antibiogramma manuale
- l'antibiogramma automatizzato
- l'antibiogramma sui micobatteri non tubercolari



*Dottore, è sicuro che ho la polmonite?
Ho saputo di un dottore che ha curato
uno per una polmonite e questo è morto di
tifo!*

*Non preoccuparti, questo a me non
accade.*

*Se dico che hai la polmonite, morirai di
polmonite.*

Grazie per l'ascolto