

# Un semplice vademecum per l'esecuzione di campionamenti significativi per l'esame batteriologico

**Martino P.A.**

*Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica (DIVET) – Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria – Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano*

## SUMMARY

Bacteriological examination plays a pivotal role in the identification of pathogens thought responsible for some infectious diseases and for the selection of antimicrobial molecules for using in therapy. To obtain an optimal result it is important a tight cooperation between microbiologist and veterinary clinician because bacteriological procedures needs some anamnestic information about animal and a clinical suspicion to perform different tests. In this paper we explain microbiological methods that could be apply for the isolation and identification of bacteria and the most important sampling methods.

## KEYWORDS

clinical bacteriology, sampling procedures, diagnostic methods

L'esame batteriologico rappresenta un indispensabile strumento per l'identificazione del/dei patogeno/i responsabili di alcune manifestazioni infettive e per l'identificazione di antimicrobici da utilizzarsi per la terapia mirata. È necessaria una stretta collaborazione tra il microbiologo e il clinico perché la ricerca vada a buon fine; infatti l'esame batteriologico si basa non solo sulle tecniche diagnostiche specifiche, ma anche sulle informazioni e sul sospetto che il clinico fornirà col campione. In questo articolo verranno fornite semplici informazioni per l'esecuzione di campioni significativi per l'esame batteriologico.

Lo scopo della batteriologia clinica è di fornire rapidamente e in modo accurato e corretto informazioni relative alla presenza o all'assenza di un batterio, in presenza di una manifestazione clinica in cui si sospetta un coinvolgimento microbico. In genere richiede dalle 24 alle 72 ore, un tempo che spesso il clinico non può o non vuole attendere; per evitare però di intraprendere un trattamento su base empirica, che può essere inefficace e portare allo sviluppo di antibiotico-resistenza, è assolutamente indispensabile che i campioni vengano inviati al laboratorio per l'isolamento, l'identificazione e la valutazione della sensibilità agli antibiotici del microorganismo responsabile.

Talvolta vi possono essere problemi di comunicazione tra microbiologo e clinico relativamente alla validità del campione inviato, all'incertezza sul significato del batterio/i isolato/i, all'interpretazione del referto e al "ritardo" tra l'invio del campione e l'esito; per evita-

re tutto questo il clinico dovrebbe cercare di fornire insieme al campione anamnesi e segnalamento per aiutare il laboratorio a "ricercare" e a ottenere risultati significativi.

## METODI DIAGNOSTICI

### *Esame microscopico diretto*

L'esame microscopico diretto, di essudati o liquidi corporei infetti, è una semplice procedura che può essere eseguita per la diagnosi e la gestione di infezioni batteriche. La valutazione permette di avere informazioni immediate sul numero, la morfologia, la risposta alla colorazione di Gram dei microrganismi e sulla risposta dell'ospite. L'esame microscopico fornisce anche informazioni sull'attendibilità del campione per la successiva coltura, sulla probabile presenza di infezione, sui microrganismi presenti in infezioni miste (cocchi e bastoncelli). Queste informazioni possono essere la base per l'interpretazione dei risultati della coltura.<sup>(1,3,5,6)</sup>

I batteri si possono facilmente osservare in uno striscio quando la loro concentrazione è superiore a  $10^4$ - $10^5$  per mL; deve essere invece evitato nel caso di sangue o liquido cefalo-rachidiano, che in genere presentano una bassa carica microbica. Nel caso delle spirochete è preferibile utilizzare la microscopia in campo oscuro. Oltre alla colorazione di Gram si possono utilizzare colorazioni semplici come blu di metilene oppure la colorazione di Giemsa.<sup>(4)</sup>

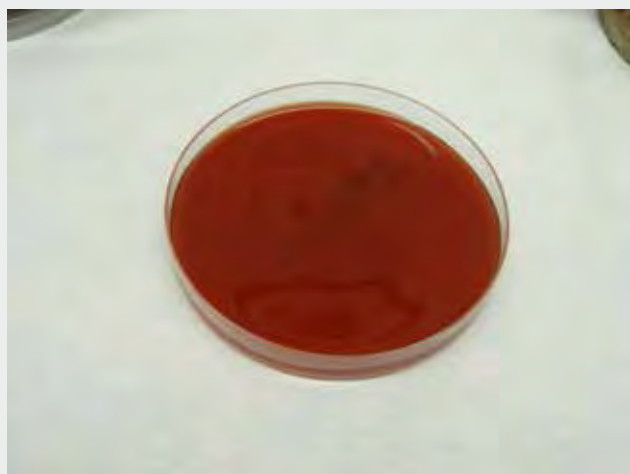


Fig. 1. Piastra di agar-sangue.



Fig. 2. Semina di un tampone su agar-sangue.

### Isolamento e identificazione

L'isolamento e l'identificazione dei microrganismi dipende da molti fattori, di cui importanti sono; la fonte del campione e l'eventuale diagnosi presuntiva fatta dal clinico o sulla base dell'esame microscopico (vedere sopra).

La maggior parte dei batteri definiti come "fastidiosi" crescono rapidamente su agar-sangue; i brodi colturali (ad es., Brain Heart Infusion Broth; Tryptic Soy Broth) permettono di arricchire campioni in cui vi sono pochi microrganismi oppure facilitano l'isolamento dei batteri "difficili". In alcuni casi, si devono utilizzare terreni selettivi per diminuire la crescita dei contaminanti e della flora normale ed "esaltare" quella dei patogeni (ad es., Rappaport broth; Selenite broth) (Figg. 1 e 2). Va sottolineato però che per alcune patologie (botulismo, tetano o enterocolite da clostridi) la diagnosi è più efficiente e rapida con l'identificazione diretta dell'antigene, la ricerca degli acidi nucleici o delle tossine.<sup>(2,3)</sup>

## RACCOLTA DEL CAMPIONE

I campioni devono essere raccolti dal sito di infezione limitando al massimo la contaminazione da parte dei tessuti adiacenti, organi o secrezioni. Per questo motivo devono essere utilizzate le tecniche di asepsi, per ridurre la quantità e la probabilità di contaminazione, unitamente a dispositivi sterili (contenitori; cateteri,

ecc.). Alcuni tipi di campioni sono accessibili solo per aspirazione o per biopsia; in tutti questi casi deve essere eseguita un'accurata disinfezione della cute prima dell'esecuzione del prelievo. I campioni dovrebbero essere raccolti il più precocemente possibile dall'inizio dell'infezione; infatti, al progredire dell'infezione i microrganismi possono morire oppure essere sovrastati da altri batteri.<sup>(5)</sup>

Quando possibile, i campioni dovrebbero essere prelevati prima della somministrazione di antibiotici; tuttavia il loro utilizzo può non pregiudicare necessariamente l'isolamento dei batteri da campioni prelevati in sedi in cui viene raggiunta una bassa concentrazione tessutale o in animali infetti da batteri antibiotico-resistenti. Se non è possibile eseguire il campionamento prima della somministrazione, il campione dovrebbe essere raccolto subito prima della dose successiva.<sup>(1,3,6)</sup>

Spesso la quantità di campione che viene inviata è insufficiente per l'esecuzione degli esami di laboratorio; ad esempio non dovrebbero essere inviati tamponi al posto di materiale bioptico o liquidi.

Nel caso in cui vi siano più lesioni o nel caso in cui vengano richiesti più esami (batterologico, micologico), devono essere eseguiti più campioni. In caso di batteriemia devono essere inviati più campioni di sangue (vedere oltre); nella ricerca di alcuni patogeni enterici (salmonelle) è necessario l'invio di più campioni di feci (vedere oltre).



Fig. 1. Tampone in terreno di trasporto.

## Strumenti per il campionamento e trasporto

Per garantire la sopravvivenza dei microrganismi senza una loro moltiplicazione eccessiva e il loro isolamento e identificazione è necessario utilizzare sistemi appropriati per il campionamento e il trasporto. Sono a disposizione diversi tipi di contenitori (per feci, urine) e di tamponi con e senza terreno di trasporto; poiché molti patogeni sono sensibili all'essiccamento, sarebbe sempre meglio eseguire i campionamenti con tamponi con terreno di trasporto. (Fig. 3) È anche possibile inviare i campioni in provette prive di anticoagulanti o sostanze preservanti oppure in siringa (per liquidi o altri materiali aspirabili), che dovrà essere accuratamente chiusa.<sup>(5,6)</sup>

## Terreni di trasporto

Esistono diversi tipi di terreni di trasporto (ad es., Stuart, Amies con e senza carbone, Cary-Blair, sistemi per anaerobi) che sono costituiti fondamentalmente da sali con l'aggiunta di agar, che permettono la sopravvivenza dei microrganismi impedendone la moltiplicazione, in modo da preservarne la tipologia e la quantità. Nel caso di emocolture è possibile utilizzare bottiglie ad hoc che contengono terreni liquidi che sono utilizzabili per altri campioni (LCR o liquido sinoviale) solo se si tratta di campioni sterili. Esistono anche sistemi per il trasporto di campioni per la ricerca di batteri anaerobi che permettono di limitare al massimo la presenza di ossigeno, letale per questi batteri (ad es., GasPak Pouch®, BBL, UK).<sup>(6)</sup>

Tutti i campioni devono essere inviati il più rapidamente possibile al laboratorio (da 4 ore a un massimo di 48 ore) e comunque mantenuti a 4 °C, eccezion fatta per i campioni per la ricerca dei batteri anaerobi che dovranno essere mantenuti a temperatura ambiente o comunque controllata.<sup>(3,5,6)</sup>

## Campioni

### Sangue

L'isolamento di microrganismi dal sangue richiede la conoscenza dell'intermittenza e della bassa concentrazione batterica osservabile in molti casi di batteriemia; per questo motivo si consiglia di raccogliere, in litio-eparina, 3-4 campioni di sangue (2-5 mL) a distanza di mezz'ora – un'ora l'uno dall'altro, di cui il primo non appena compare la febbre. L'isolamento dello stesso microrganismo in più campioni permette di ritenerlo responsabile della sintomatologia in atto.<sup>(1,3,6)</sup>

### Urina

La tipologia di prelievo, la conservazione del campione e il trasporto rappresentano eventi molto importanti per la significatività dei campioni di urina. Infatti a seconda della modalità di prelievo varierà il valore di batteriuria significativa (espresso come UFC/mL). Il prelievo per minzione spontanea, con raccolta del getto di mezzo (usato in genere in medicina umana), non rappresenta un buon prelievo per l'esame batteriologico a meno che il prelievo eseguito con altre modalità non risulti negativo. Il prelievo per cateterizzazione è attualmente

il meno utilizzato in quanto traumatico per l'animale (a meno che non sia già cateterizzato a scopo diagnostico o terapeutico) e per il rischio di contaminazione da parte della microflora cutanea. Il prelievo per cistocentesi ci permette di ottenere un campione ideale per l'esame batteriologico. Poiché l'urina permette la crescita microbica, deve essere immediatamente refrigerata e non lasciata a temperatura ambiente per più di 1 ora; pertanto il campione di urina deve essere inviato nel più breve tempo possibile al laboratorio che lo processerà altrettanto rapidamente. Nel caso di ricerca di *Leptospira* in campo oscuro, a 20 mL di urina vanno aggiunti 1,5 mL di formalina al 10%.<sup>(1,3,6)</sup>

## Trasudati ed essudati

Questo tipo di campioni può essere raccolto mediante una siringa che dovrà essere poi accuratamente chiusa, dopo aver eliminato l'aria presente; nel caso di aspirati tracheali o lavaggi bronco-alveolari, questi possono essere raccolti in provette da inviare unitamente a un campione della soluzione utilizzata per il lavaggio, in modo da controllare che questa sia sterile così come il canale endoscopico.<sup>(3)</sup>

## Feci

In genere, non viene prestata una grande attenzione alla raccolta e alla conservazione delle feci o di tamponi rettali, nonostante sia molto importante nel caso in cui si ricerchino particolari patogeni. Infatti, nel caso delle salmonelle ad esempio, anche se il campione è stato raccolto e conservato appropriatamente, esse possono non sopravvivere a causa dell'acidificazione delle feci durante il trasporto e la conservazione. Il campione migliore è rappresentato da qualche grammo (2-3) di feci anche se è possibile l'invio di tamponi rettali; inoltre, la presenza di muco e sangue sono indicatori di una maggiore proliferazione microbica.<sup>(1,6)</sup> Spesso è necessario eseguire più colture in serie (ma non ne sono assolutamente richieste 3 sequenziali) perché alcuni microrganismi possono essere presenti in concentrazioni diverse durante l'evoluzione della manifestazione enterica; in altri casi (ceppi enterotossigenici) il solo isolamento non è sufficiente ma è indispensabile l'identificazione della tossina (ad esempio, nel caso della tossina A di *Clostridium perfringens*).<sup>(3)</sup>

## Campioni biotici

I campioni biotici possono essere molto importanti per la valutazione microbiologica e devono essere mantenuti in modo da evitare la contaminazione e l'essiccamento, che possono diminuire il loro valore diagnostico. Nel caso in cui più siti siano clinicamente coinvolti, dovranno essere raccolti più campioni; se si tratta di ascessi, andrà raccolto materiale dalle pareti mentre il pus non è significativo. Se si tratta di raccolte di liquido, questo andrà prelevato con siringa sterile piuttosto che con un tampone.<sup>(3)</sup>

Una valutazione particolare va fatta nel caso di campioni necroscopici inviati al laboratorio per l'esame batteriologico; in tal caso i campioni provenienti dall'apparato

gastro-enterico dovranno essere prelevati per ultimi per evitare contaminazioni degli altri organi/tessuti.<sup>(3)</sup>

## CONSIDERAZIONI FINALI

La gestione del campione rappresenta il fattore che più influenza l'accuratezza dei risultati dell'esame batteriologico; campioni scelti, raccolti, trasportati o conservati in modo non corretto possono portare a errori diagnostici e, di conseguenza, terapeutici. In genere il laboratorio microbiologico indica al clinico le

migliori modalità per l'esecuzione e la conservazione del campione ma è altrettanto importante che con esso vengano inviate le informazioni anamnestiche relative e l'eventuale sospetto, che possono indirizzare le procedure di laboratorio.

Questo semplice vademecum vuole quindi fare un po' di chiarezza sui metodi di raccolta dei campioni per l'indagine batteriologica, per aiutare il veterinario pratico ad ottenere risultati di qualità partendo da un campione di qualità.

## BIBLIOGRAFIA

1. Carter G.R., Wise D.J.: *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 6th Ed., Iowa State Press, Blackwell, USA, 2004.
2. Houpikian P., Raoult D.: *Traditional and molecular techniques for the study of emerging bacterial diseases: One laboratory's perspective*. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 122-131, 2002.
3. Jones R.L.: *Laboratory Diagnosis of bacterial infections*. In: Greene C.: *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd Ed., Elsevier Inc., Philadelphia, USA, 2006.
4. Murray P.R. (Editors): *Manual of Clinical microbiology*. 7th Ed., American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 1999.
5. Poli G., Cocilovo A., Dall'Ara P., Martino P.A., Ponti W.: *Microbiologia e immunologia veterinaria*. 2nd Ed., UTET S.p.A. Scienze Mediche, Torino, 2005.
6. Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J., Leonard F.C.: *Veterinary Microbiology and Microbial disease*. Iowa State University Press, Ames, IA, USA, 2002.

## Norme per gli autori

Ogni lavoro deve essere redatto secondo il seguente schema:

- Titolo: breve, chiaro, conciso, facilmente classificabile in un indice analitico.

- Summary and Key Words.

- Testo: il testo va scritto senza formattazione.

- Tabelle, grafici, disegni, schemi e fotografie: debbono essere numerati e corredati di didascalia esplicativa. Impostazione per le didascalie di Tabelle/figure:

.Tabella/grafico/schema

Esempio

Tab.1. + didascalia per esteso che termina senza il punto finale  
.Foto/Figura/disegno

Esempio

Fig.1. + didascalia per esteso che termina senza il punto finale  
La dicitura Fig. (Figg. se il riferimento è a più figure) e Tab. (Tabb. se il riferimento è a più tabelle)

vanno inserite nel testo al termine del capoverso che ne fa riferimento seguite dal punto finale.

- Bibliografia: la bibliografia deve essere presentata in ordine alfabetico in base al cognome del primo autore, numerata e richiamata nel testo, come qui indicato.<sup>(1)</sup>

La bibliografia va compilata secondo i seguenti esempi:

- Riviste

Esempio

1. Bianchi M., Rossi A.: titolo del lavoro. Riv, 2004, 54, 250-255.

- Testi

Esempio

1. Verdi G., Rossi A.: titolo del libro. Casa editrice, Milano, 2004.

- Capitoli di testi

Esempio

1. Rossi M., Bianchi L.: nome capitolo. In: nome libro, casa editrice, Milano, 2004.

- Atti (proceedings) di congressi

Esempio

1. Rossi M.: titolo del lavoro. Proc (Atti), Nome congresso, 2004, 27, 210-214.

### INVIO DEI LAVORI

Il materiale va inviato a: [bollettino@aivpa.it](mailto:bollettino@aivpa.it)

Oppure a:

Dott.ssa Barbara Simonazzi

Dip. Salute Animale Università di Parma

Via del Taglio 8 - 43100 Parma