

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Esami culturali in generale	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1-Principio del Test

Inoculazione del campione clinico in mezzi di coltura definiti per l'isolamento di batteri patogeni .

2-Applicazione clinica

Le colture, realizzate a partire da diversi materiali clinici, servono a isolare ed identificare microorganismi sospetti di essere la causa del processo infettivo presente nel paziente.

3 Campioni

LIQUIDI BIOLOGICI STERILI (liquor, liquido ascitico, pleurico, sinoviale , ecc.)

RACCOLTA- Si deve raccogliere 5-10 ml di LCR (liquido cefalo rachidiano-liquor) in una provetta sterile, per mezzo di una puntura lombare o ventricolare, che deve essere eseguita in maniera corretta da un medico. La minuziosa disinfezione della pelle è indispensabile, dato il pericolo di una meningite batterica iatrogena. Il campione va consegnato al laboratorio al più presto e processato immediatamente , dato che le cellule si disintegrano rapidamente. Inoltre il non corretto prelievo può risultare , all'esame microscopico, in una presenza di cellule che non riflettono la situazione clinica del paziente.

Nel caso non si abbia possibilità della consegna immediata al laboratorio, si deve collocare la provetta , che contiene il materiale , in termostato E MAI IN FRIGORIFERO! Il contenuto del recipiente può essere diviso in 2 parti o più (asetticamente), che sono destinati ai settori del laboratorio per la realizzazione degli esami. Gli altri liquidi biologici (che come il LCR sono normalmente sterili) possono essere raccolti in una siringa, dopo attenta disinfezione della pelle.

SEMINA: si inoculano almeno 5 ml di campione nelle bottiglie da emocoltura del tipo Hemoline

HEMOLINE ®TERRENO DIFASICO

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Fase liquida	Fase solida
Peptone di caseina 10	Peptone di caseina 10
Peptone di gelatina 10	Peptone di gelatina 10
Estratto di lievito 5	Estratto di lievito 5
Glucosio 3	Glucosio 1
NaCl 5	NaCl 5
L-arginina 1	L arginina 1
Piruvato di sodio 1	Piruvato di sodio 1
Emina 0.005	Emina 0.005
Menadione (Vit K3) 0.0005	Menadione Vit K3 0.0005
Cloridrato di Piridossale (Vit B6) 0.01	Tris (idrossimetil) aminometano 0.7
NAD 0.01	Agar + polisaccaride di emisintesi 19
SPS 0.25	PH finale 7.3
Bicarbonato di sodio 0.2	
Tris (idrossimetil) aminometano 1.7	
PH finale 7.3	
I numeri sono in gr/L	

I fattori di arricchimento conetnuti nei due terreni hanno lo scopo di favorire lo sviluppo di microorganismi esigenti.

- ➔ peptone di caseina e di gelatina fornisce aminoacidi
- ➔ l'estratto di lievito apporta purine e pirimidine e vitamine
- ➔ l'emina e il NAD (=fattore X e fattore V) consentono lo sviluppo dell'Haemophilus e favoriscono anche la crescita di germi esigenti quali il Cardiobacterium e l'Actinobacillus
- ➔ Il cloridrato di Piridossale (vit B6) è essenziale pe rlo sviluppo degli streptococchi "deficienti" riscontrabili nelle endocarditi e di alcuni stafilococchi.
- ➔ la CO₂ contenuta nella fase gassosa è un importante elemento di crescita per Neisseria, Brucella, Haemophilus e pneumococchi.

SECREZIONI DA FERITE O PUS

RACCOLTA- Non è possibile qui descrivere in dettaglio i procedimenti per la raccolta dei campioni delle secrezioni da ferite chirurgiche , ascessi , ecc.Si deve evidenziare che questo compito richiede una stretta collaborazione fra laboratorio e medico.In molti casi , esiste appena una possibilità di ottenere un solo campione,il secondo campione non esiste in molti casi o è difficile da ottenere. Pertanto, la raccolta, il trasporto e la conservazione corretta di questi campioni sono di somma importanza e deve evitarsi ogni errore. Subito che un campione è ottenuto in reparto , registrato e inviato in laboratorio, esso deve essere processato al piu' presto

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

possibile .Il materiale deve essere raccolto con l'ausilio di un tampone fornito dal laboratorio e introdotto nel mezzo di trasporto . I piu' comuni mezzi di trasporto sono presenti nei tamponi sterili a base di Dacron.

Il Dacron è un fibra sintetica con minore attività inibente, per la maggior parte dei microorganismi, rispetto ad altri materiali (p.e. cotone o alginato di calcio) esso è alla base per esempio dei tamponi Cultiplast®.

Tampone Cultiplast® con mezzo di trasporto:

colore	Mezzo di trasporto
Blu	Amies
Verde	Stuart
Nero	Amies con carbone
Rosso	Stuart con carbone

I terreni di trasporto piu' diffusi sono il terreno di Stuart e il terreno di Amies, classico o addizionato con carbone attivo, sebbene questo ultimo terreno sia indispensabile solo per la ricerca di microorganismi particolarmente delicati, quali il gonococco e i batteri patogeni intestinali. Sono terreni semisolidi non nutritivi .La presenza di sodio tioglicolato, abbassa il potenziale redox del mezzo , permettendo una migliore conservazione dei batteri anaerobi.Il glicerofosfato del terreno di Stuart , utilizzato dai coliformi come fonte di energia per la crescita, è sostituito nel terreno di Amies da una soluzione salina tamponata:in questo modo si evita la sovracrescita dei contaminanti banali soprattutto nei campioni dove si ricerca il gonococco.Il mezzo di trasporto di Amies consente una conservazione degli streptococchi beta emolitici per piu' di 3 giorni.

Nel caso di raccolte ascessuali, francamente purulente si raccomanda la raccolta con una siringa .Essa è sufficiente anche a mantenere condizioni di anaerobiosi originali per molto tempo.

SEMINA:

Il tampone da ferita si semina direttamente sui 4 terreni

- Agar sangue normale
- Agar cioccolato PoliVitex senza inibitori
- Agar sale manite
- Agar Mac Conkey

i primi due si incubano a atmosfera di CO2 nelle apposite giare per 24-48 ore.

Il restante tampone si stempera nel brodo Trypticase soy broth o brodo tioglicollato nel caso si sospetti una infezione da anaerobi

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

TRATTO GENITALE MASCHILE:

RACCOLTA:

Per la raccolta di campioni dall'uretra, un tampone di piccolo diametro o una ansa batteriologica sterile deve essere inserita 3-4 cm dentro l'uretra ruotando gentilmente prima di ritirarla. Le secrezioni purulente possono essere raccolte direttamente in un tampone o in una ansa batteriologica. Il campione deve essere immediatamente inoculato. I campioni ano-rettali sono ottenuti con l'inserzione di un tampone 4-5 cm dentro il canale rettale.

L'idelae sarebbe che i campioni per l'isolamento di *N.gonorrhoeae* fossero inoculati direttamente in laboratorio, in un mezzo di coltura appropriato. Le piastre vanno collocate in una atmosfera che contenga 5-10% di CO₂ (giara o busta generbag ®) e alta umidità. Se non si ha possibilità del piastramento e incubazione immediata, si deve usare un mezzo di trasporto (es: Stuart). Il tempo per il trasporto deve essere il più breve possibile, non dovendo eccedere 12 (dodici) ore a temperatura ambiente fino a 30°C. Si deve assolutamente evitare la refrigerazione del campione (i gonococchi sono molto sensibili alle temperature basse).

TRATTO GENITALE FEMMINILE:

RACCOLTA- Tutti i campioni devono essere raccolti durante l'esame pelvico con uso di speculum (fatto da un medico). I mezzi di trasporto (Stuart, Gonolab®) sono adeguati per il trasporto di campioni cervico vaginali, con l'eccezione dei campioni che debbono essere testati per la ricerca di Micoplasmi genitali, poiché si ha la necessità di usarsi un mezzo di trasporto specifico. Questo mezzo di trasporto sarà inviato al centro prelievi.

TRATTO RESPIRATORIO:

RACCOLTA:

Faringe: in condizioni normali, i campioni vanno raccolti da un medico o personale addestrato. Il paziente deve sedersi di fronte una fonte di luce. Sostenendo la lingua in basso con un apposito abbassatore, si sfrega vigorosamente il tampone sterile di cotone o Dacron® sopra ogni tonsilla, sopra la parete posteriore del faringe e sopra le altre aree infiammate. Si deve fare attenzione a non toccare la lingua o la superficie boccale. Di preferenza si devono prendere due tamponi dalla stessa area. Uno si può usare per preparare uno striscio, mentre l'altro viene posto nel mezzo di trasporto e inviato in laboratorio. Altrimenti entrambi i tamponi vanno inviati in laboratorio.

Lo sputo (sinonimo: espettorato, escreato), va collocato in un recipiente sterile a bocca larga, con coperchio a vite che si chiude molto bene e mandato in laboratorio al più presto. Se lo sputo non viene processato immediatamente dopo la raccolta, la crescita eccessiva di batteri contaminanti è possibile che avvenga prima dell'esecuzione dell'esame e, di conseguenza, il risultato degli strisci e delle colture presentano molti equivoci. E' raccomandabile far fare al paziente degli sciacqui con soluzione fisiologica prima della raccolta.

4 STANDARD, CONTROLLI, REAGENTI

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Per la coltura di routine , si utilizzano i seguenti mezzi:

MEZZO DI TRASPORTO DI STUART:

Mezzo di trasporto e conservazione di campioni contenenti germi patogeni come *Neisseria*, *Trichomonas*, *Haemophilus*, pneumococchi, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, etc., con conservazione della flora batterica secondo STUART (1946) , migliorato da RINGERTZ (1960):

PRINCIPIO DI AZIONE: La carenza di una fonte di azoto impedisce considerevolmente la moltiplicazione dei germi .La composizione di questo mezzo garantisce la sopravvivenza sufficientemente lunga dei microrganismi .Il mezzo contiene una sufficiente anaerobiosi , che puo' essere controllata mediante un indicatore redox blu di metilene.

COMPOSIZIONE (g/L): Glicerofosfato di sodio (10); Tioglicolato di sodio (1), Cloruro di calcio (0,1); Blu di metilene (0,002); Agar (8). pH=7,2-7,6

PREPARAZIONE: Vedi Manuale Biolife 3a edizione.

IMPIEGO: Si raccoglie il materiale che deve essere investigato con un tampone sterile .Si introduce il tampone nel mezzo fino alla metà della sua altezza e si lascia cosi' , chiudendo ermeticamente la provetta, che si puo' conservare a temperatura ambiente fino al suo trasporto in laboratorio.

BRODO INFUSO CUORE CERVELLO (*Brain-Heart-Infusion* - B.H.I.):

Mezzo adeguato per la coltura primaria di molti batteri esigenti e no, come streptococchi, pneumococchi, meningococchi, enterobatteri, ecc. E' specialmente consigliato per gli stafilococchi nel test della plasma coagulasi libera.E' la base delle emocolture .La crescita di germi anaerobi o microaerofili è migliorata con l'aggiunta di piccole quantità di Agar (circa 0.05-0.2%)

BRODO TIOGLICOLATO:

Mezzo usato per la coltivazione e l'isolamento di germi microaerofili e anaerobi stretti.

PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO: le sostanze riducenti (tioglicolato e cisteina) forniscono una anaerobiosi sufficiente, soprattutto per gli anaerobi esigenti. La elevata viscosità del mezzo impedisce la penetrazione rapida dell'ossigeno. Un aumento nella concentrazione dell'ossigeno si manifesta con il viraggio a rosa dell'indicatore redox resazurina.

COMPOSIZIONE (g/l): Peptone di caseina (15);estratto di lievito (5); D (+) glucosio (5.5);L (+) cisteina (0.5);NaCl (2.5); tioglicolato di sodio (0.5) ; Resazurina sodica (0.001).pH =6.9-7.3.

PREPARAZIONE: Dissolvere 29 g/l , distribuire in tubi e sterilizzare in autoclave (15 min/ 121 °C).Il mezzo pronto è chiaro e di colore giallastro. Non si deve utilizzare quando i tubi hanno un colore rosa in piu' di 1/3 dell'altezza del brodo (dovuto a penetrazione di ossigeno).I tubi devono essere mantenuti fuori dal frigorifero o al riparo della luce.

AGAR SANGUE COLUMBIA (O MULLER HINTON)

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Si usa il mezzo di Mueller-Hinton (o Agar Columbia) come base. Dopo la sterilizzazione si deve lasciare raffreddare fino a circa 45°-50° C per essere addizionato di circa il 5-8% di sangue defibrinato di montone .Mettere in piastre di Petri. Dopo la preparazione il mezzo di coltura ha una colorazione rossa caratteristica.

PRINCIPIO DI AZIONE: La sua abbondante base nutritiva offre condizioni ottimali di crescita a tutti i microorganismi. Il valore di pH 6.8, oltre alla concentrazione delle emazie scelta , è specialmente favorevole per la conservazione degli eritrociti e per la formazione di aloni di inibizione chiari.

AGAR CIOCCOLATO:

Mediante riscaldamento, dopo la preparazione dell'Agar sangue, si ottiene l'Agar cioccolato, che è un eccellente mezzo di coltura.

PREPARAZIONE: dopo aver preparato l'Agar sangue e agitando frequentemente, si mantiene il mezzo a circa 80°C durante circa 10 minuti fino a che si ottiene un colore "cioccolato").

AGAR MAC CONKEY:

Agar selettivo per l'isolamento di enterobatteri a partire da feci, urina, alimenti, acque reflue , ecc., secondo Mac Conkey (1905).

PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO: I sali biliari e il cristal violetto inibiscono considerevolmente la flora Gram (+) .Il lattosio , assieme con l'indicatore di pH rosso neutro , serve come prova della fermentazione dello zucchero.

COMPOSIZIONE (g/l) : peptone (83);peptone di caseina (17) , NaCl (5), lattosio (10), miscela di sali biliari (1.5), rosso neutro (0.03), cristal violetto (0.001), Agar (13.5).

PREPARAZIONE: Dissolvere 50 g/l , sterilizzare in autoclave (15 min /121 °C) e piastrare in piastre Petri.

INTERPRETAZIONE: Colonie lattosio (-) sono incolore e le lattosio (+) sono rosse , con un alone torbido , dovuto all'abbassamento del pH provocato dagli acidi biliari formati.

COLONIE	MICROORGANISMI
Incolori, trasparenti	<i>Salmonella spp.</i> / <i>Shigella spp.</i> , altri
Grandi, rosse, con un alone rosso	<i>Escherichia coli</i>
Grandi, rosse, mucoidi	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Klebsiella spp.</i>
Piccole, crescita isolata, opache	Enterococchi, Stafilococchi e altri

AGAR THAYER MARTIN (BASE):

Mezzo destinato all'isolamento di *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* a partire da materiale clinico .Il mezzo è superiore ad altri mezzi di coltura destinati allo stesso scopo, quanto alla resa di crescita dei patogeni e inibizione di Neisserie saprofite e altri batteri.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

E' pertanto adeguato, soprattutto per materiali molto contaminati dalla flora concomitante (secrezioni vaginali, uretrali, tamponi faringei).

PRINCIPIO DI AZIONE: Con l'aggiunta di diversi antibiotici, così' come dei fattori stimolanti la crescita che completano il substrato basale, con o senza aggiunta di sangue, si ottiene, di regola, l'inibizione totale della crescita della flora concomitante onde le Neisserie patogene crescono senza ostacolo.

COMPOSIZIONE: (g/l): Proteosopeptone(15); D(+) glucose (1); Amido solubile(1); idrogenofosfato dipotassico (4); Diidrogenofosfato potassico (1); NaCl (5); Agar-Agar (12).

PREPARAZIONE: Dissolvere 39 g/l e sterilizzare in autoclave (15 min/121 °C). Quando si raggiunge la temperatura di circa 50°C, incorporare una boccetta di supplemento I e una altra di supplemento II per circa 200 mL di mezzo base. Mettere in piastre Petri o preparare tubi a becco di clarino pH=7,0-7,4. Quando si prepara questo mezzo in una base di Agar cioccolato, il procedimento è il seguente :quando si raggiungono gli 80°C , aggiungere 50 mL di sangue defibrinato al mezzo basale e mantenere questa temperatura , agitando frequentemente fino a che il mezzo diventa di aspetto "cioccolato". Quindi raffreddare fino a circa 50°C e incorporare i due supplementi I e II.

-Supplemento I: Mistura liofilizzata, sterile, di 3 antibiotici: Vancomicina, Colistina, Trimetoprim nelle concentrazioni 0,6 , 1,5, e 1,0 mg per ogni boccetta. Questa miscela è ricostituita con 2mL di acqua distillata sterile.

-Supplemento II: Miscela liofilizzata, sterile, di sostanze attive, chimicamente definite, che favoriscono la crescita dei germi esigenti. Viene ricostituito con 2mL di acqua distillata sterile.

COMPOSIZIONE (mg/boccetta): tiamina(0,006); Adenina (2); L-glutammina (20); L-cistina (2,2); Acido 4-amino benzoico (0,026); L-cisteina (51,8); Cloridrato di guanina (0,06); Vitamina B12 (0,02); Carboxilase (0,2); Nicotinamide-adenina-dinucleotide NAD (0,5) e Nitrato ferrico (0,04).

MEZZI SELETTIVI PER I MICOPLASMI UROGENITALI (Bio-Mérieux):

Mezzi selettivi sviluppati per l'isolamento e l'identificazione dei micoplasmi urogenitali.

FORMULA: Il mezzo contiene i fattori di crescita necessari allo sviluppo ottimale dei micoplasmi (peptone, estratto di lievito, siero di cavallo, ecc.). Il substrato specifico presente nel mezzo (urea per *U.urealyticum* e arginina per *M.hominis*) e l'indicatore di pH rosso fenolo rivelano cambiamento di colore nel caso di colture positive , causando l'aumento del pH del mezzo. La combinazione di 3 antibiotici e un antifungino forniscono una grande selettività, garantendo che la flora contaminante presente nel campione non alteri il test.

COMPOSIZIONE: bio-Miotone (8,0); bio-Trypticase (8,0); Estratto di lievito (4,0); NaCl (3,5); Arginina (5,0); Cisteina (0,1); Uréa (0,5); Rosso fenolo (0,05); IsoVitaleX® (10mL); Siero di cavallo(100mL); Miscela antibiotica (10mL); Acqua distillata 1.000mL; pH finale 6,3.

Per la coltura del BK (Bacillo di Koch *Mycobacterium tuberculosis hominis*) , si utilizza di routine il seguente mezzo:

Terreno di Lowenstëin-Jensen per la ricerca del B.K.:

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Mezzo di coltura utilizzato per la dimostrazione dei micobatteri che causano la tubercolosi.

COMPOSIZIONE (g/l): diidrogenofosfato di potassio (2.5); solfato di magnesio $-7H_2O$ (0,24); tricitrato di magnesio- $14H_2O$ (0.6); L-asparagina (3.6); verde malachite (0.4); fecola di patata (30).

Additivi: glicerina (12ml); omogenato di uova (1 litro). pH=4,7-4,9 (prima dell'aggiunta dell'omogenizzato).

Il mezzo di coltura è di colore verde chiaro e viene utilizzato sempre in tubi e disposto in forma inclinata all'interno dello stesso, che è chiuso ermeticamente (con tappo proprio) dopo l'aggiunta del materiale biologico che deve essere investigato. L'incubazione va da 14 giorni a 60 giorni a 37°C. Al quattordicesimo giorno e poi ogni settimana, si ispeziona il mezzo per l'osservazione della crescita di colonie.

COLONIE	MICRORGANISMI
Opache, rugose, quasi sempre giallastre e a volte incolori	<i>Mycobacterium tuberculosis hominis</i>
Rugose, con colorazione arancio (quando esposte alla luce)	<i>Mycobacterium kansasii</i> - <i>M. marinum</i>

5 Strumenti

La identificazione biochimica dei microorganismi isolati, come la realizzazione degli antibiogrammi sono realizzati con sistema automatico (Microscan® W/A della Dade Behring). Per la tipizzazione del bacillo di Koch si ricorre al test di conferma con il sistema LCX Abbott®

6 Procedimento dettagliato

LIQUIDI BIOLOGICI:

ESAMI MACROSCOPICI:

L'aspetto macroscopico di questo tipo di materiale deve essere osservato e annotato come: chiaro, torbido, purulento, giallo o xantocromico (per presenza dell'emolisi o itterizia), con sangue, con pellicola di fibrina.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:

Se il liquido cefalo rachidiano è molto purulento (molto torbido), esso può essere immediatamente esaminato senza centrifugazione. Nel restante caso, il LCR, deve essere centrifugato in un tubo sterile a 2000-25000 rpm per 5-10 minuti. Il sovrantante deve essere rimosso usando una pipetta sterile con un bulbo di gomma e trasferito in un altro tubo per l'analisi chimica fisica e/o sierologica. Il sedimento è usato per i test microbiologici addizionali.

ESAMI MICROSCOPICI: Si deve sempre fare uno striscio del campione in un vetrino limpido e sgrassato, per la colorazione con il metodo di Gram. La colorazione di Ziehl Neelsen si deve

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

realizzare in questo tipo di campione solo dietro sollecitazione medica quando si sospetta meningite tubercolare.

COLTURA:

FERITE E SECREZIONI DIVERSE:

SEMINA DI ROUTINE: I tamponi da ferite e il materiale purulento si deve seminare nei seguenti mezzi di coltura:

-Agar sangue (o cioccolato) + Agar Mac Conkey + brodo BHI

E' importante che il pus venga diluito in terreno liquido di arricchimento come il BHI. Una parte del campione così diluito si può seminare sui terreni solidi anzidetti. Incubare per almeno 3 giorni a 37°C. In caso di torbidità della brodo coltura, con negatività della semina diretta sui terreni solidi, si trapianta nei terreni solidi. La nostra esperienza su raccolte ascessuali, materiali purulenti da ferite chirurgiche o da diabete ci dice che la semina di qualche goccia di pus in brodo cuore cervello o anche nella bottiglia da emocoltura è assolutamente necessaria per un recupero ottimale dell'eventuale flora batterica. Il pus è un ambiente ostile alla crescita batterica e spesso anche all'esame diretto non si evidenziano batteri. Nel caso che il materiale purulento faccia sospettare la presenza di flora batterica anaerobia, si consiglia la semina in brodo per anaerobi o in terreni con atmosfera anaerobia previa diluizione in brodo per anaerobi.

TRATTO GENITALE MASCHILE E FEMMINILE:

SEMINA DI ROUTINE: I campioni dei tratti genitali maschile e femminile devono essere seminati di routine nei seguenti mezzi di coltura (un discorso a parte merita la ricerca di micoplasmi genitali):

Per il tratto genitale femminile (tamponi vaginali):

-Agar sangue + Agar Mac Conkey + Sabouraud + opzionale: Agar sale mannite + Agar sangue con il 10% di sangue umano per la ricerca di Gardnerella.

Per il tratto genitale maschile (tampone uretrale):

-Agar cioccolato (incubazione in microaerofilia) + brodo BHI + Agar Mac Conkey e sistema Gonoslide® con pasticca generatrice di CO₂.

TRATTO RESPIRATORIO:

PROCESSAMENTO: All'arrivo in laboratorio, questo tipo di campione può seguire vari percorsi, dipendendo dalla sollecitazione medica, cioè dalla richiesta specifica del medico:

Richiesta di colorazione per BAAR (bastoncelli alcool-acido resistenti): viene fatta a partire dallo striscio del materiale in studio in vetrini puliti e sgrassati con alcool.

Coltura per il BK (bacillo di Koch): saranno utilizzati mezzi di coltura specifici (già descritti) per la coltura dei micobatteri che eventualmente sono presenti nel campione.;

Colorazione per i funghi: Viene fatta a partire da un piccolo inoculo. Preparare un vetrino pulito e sgrassato con alcool. L'inoculo viene fatto da un campione chiarificato con KOH al 20%

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

per almeno 30 (trenta) minuti a caldo e dopo che il vetrino porta oggetti viene coperto da un vetrino copri oggetto, si osserva a x40 la presenza di strutture fungine. E' consigliabile per la colorazione estemporanea il blu di lattofenolo.

Colorazione di *Pneumocystis carinii* : Viene fatta con la tecnica della impregnazione argentea del campione o con la colorazione di Giemsa;

SEMINA DI ROUTINE: I campioni del tratto respiratorio devono essere seminati nei seguenti mezzi di coltura (eccetto che nel caso di richiesta di coltura per bacillo di Koch o colorazione di *Pneumocystis carinii*):

-Agar sangue senza CNA con incubazione in CO₂ con dischetto di optochina + Agar cioccolato + Agar Mac Conkey + Agar Sabouraud CAF nel caso di broncoaspirati.

Per la realizzazione della coltura di BK, è necessario che il materiale sia trattato per eliminare la flora associata contaminante. Questo processo occorre fondamentalmente con l'utilizzo di soluzioni alcaline con sostanze fluidificanti, che non interferiscono direttamente sulla vitalità dei micobatteri, dato che questi microorganismi presentano resistenza significativa (quando esposti a tempi e concentrazioni opportune) alle sostanze alcaline. Fra i metodi definiti per questa azione si cita il vecchio metodo di Petroff (che utilizza l'NaOH come elemento di decontaminazione e digestione) o il metodo più' accettato che si utilizza per il sistema MGIT[®] che utilizza NaOH per la decontaminazione e l'N-acetil cisteina per la fluidificazione.

METODO DI PETROFF:

- 1) Si mette il campione in una provetta con tappo filettato (provettoni da 50 mL da centrifuga) e si pipetta in un eguale volume dell'espettorato o sedimento urinario l' NaOH 4%. Chiudere bene il tappo; il tempo di contatto del campione con l'NaOH dovrà essere, al massimo, 1 ora, per non aver perdita significativa di micobatteri vitali;
- 2) Si agita al vortex per approssimativamente 2 (due) minuti in modo da omogeneizzare il campione;
- 3) Si agita durante 20 (venti) minuti in un agitatore di Kahn, che permetterà una buona omogenizzazione. In alternativa, si tengono i provettoni a 37°C durante 15 (quindici) minuti (a bagno maria), agitando manualmente ogni 5 (cinque) minuti;
- 4) Centrifugare a 3000 rpm per 15 (quindici) minuti;
- 5) Terminata la centrifugazione, lasciare riposare, senza aprire il tappo, durante 5 (cinque) minuti, al fine di evitare formazione dell'aerosol;
- 6) Eliminare attentamente l'aerosol in un dispositivo speciale a tenuta stagna, contenente fenolo al 5%;
- 7) Risospendere il sedimento con l'ausilio di una pipetta;
- 8) Mettere HCl 1N goccia a goccia fino a quando la soluzione raggiunge la neutralità. A tal fine è bene usare un indicatore di pH come il rosso fenolo che quando vira a pH neutro passa da rosso a incolore o giallastro. Il passaggio rosso=> giallo è netto. Per la semina, si imbeve un tampone sterile nel sedimento neutralizzato e si semina in due tubi di Lowenstein-Jensen. La semina di routine è realizzata in provette inclinate che contengono il mezzo di Lowenstein-

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Jensen e, come metodo alternativo, si utilizza la coltura in tubi del sistema MGIT[®] (Becton-Dickinson).

SISTEMA Bact/Alert 3 D (Organon –Teknika):

INDICAZIONI:

Il sistema Bact/Alert 3 D per la coltura dei micobatteri prevede la coltura in bottiglie contenenti un mezzo liquido e miscela di antibiotici e un sistema di rilevamento della crescita. Queste bottiglie vengono inserite nell'apparecchio in specifici pozzetti. Viene monitorata la produzione di CO₂ che viene elaborata da uno specifico software.

TIPO DI CAMPIONI:

Tutti i tipi di campioni clinici, sia polmonari che extra polmonari (eccetto il sangue), possono essere processate per l'isolamento primario in specifiche bottiglie da inserire nello strumento Bact/Alert 3D.

REAGENTI:

Le bottiglie contengono brodo Middlebrok 7 H9 modificato + glicerolo+ peptone di caseina ;

➤ MT:bottiglia contenente 15 ml di brodo di arricchimento Middlebrok (albumina bovina, destrosio, catalasi e acido oleico);

➤ SUPPLEMENTO: si tratta di boccettine che contengono dopo ricostituzione una miscela di agenti antimicrobici per la inibizione della flora concomitante (polimixina B, anfotericina B, acido nalidixico, trimetoprim e azlocillina).

DIGESTIONE, DECONTAMINAZIONE E CONCENTRAZIONE:

I procedimenti sono gli stessi del metodo di Petroff, con la eccezione dei reagenti utilizzati (miscela di NaOH + N-acetil L- cisteina kit Snap ' n' Digest[®] SDL-Oxoid).

E' questo il metodo di gran lunga preferito per la fluidificazione e decontaminazione dei campioni quali sputo, liquido di lavaggio bronchiale e tracheale. L'azione fluidificante della N-acetil Cisteina e quella chiarificante sulle eventuali cellule epiteliali presenti e leucociti della soda, permette una maggiore concentrazione dei micobatteri. Il fluidificante è contenuto in fiale di vetro in forma disidratata, poiché sciolto ha una perdita di attività molto rapida nel tempo, dovuta alla sua rapida ossidazione a cistina.

COMPOSIZIONE: Flacone da 75 mL .Citrato di sodio (0.1 M) 2.9%;NaOH idrato di sodio 4%;Componenete liofilo: N-acetil-L-cisteina:0,375 gr /fiala.

Localizzare la fiala nel flacone;Aprire il tappo a vite;premere in verticale fino a rompere la fiala ;Agitare dolcemente per fare sciogliere la Cisteina.

KIT SNAP'N'DIGEST[®] SDL (Oxoid)

- 1) Si mette il campione in una provetta con tappo filettato (provettoni da 50 mL da centrifuga) e si aggiunge un eguale volume di NaOH 4% + N-acteil cisteina (schiacciando la fialetta che

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

lo contiene e liberando la cisteina nella soluzione alcalina).La concentrazione finale sarà approssimativamente del 2% ; il campione da processore nel provettone non deve superare i 5 mL;

- 2) Dopo aver tappato bene il provettone, si agita al vortex per approssimativamente 2 (due) minuti in modo da omogeneizzare il campione .Se il campione viscoso non si scioglie, aggiungere altra soda-NALC e ripetere l'agitazione al vortex. NaOH (soda) ha anche una azione di distruzione di eventuali cellule epiteliali oltre che di fluidificazione assieme alla N-acteil cisteina .
- 3) Si lascia a temperatura ambiente per circa 15 minuti , agitando delicatamente ogni 5 minuti;
- 4) Si aggiunge il tampone fosfato sterile a pH 6.8.Il tampone ha la funzione oltre che di tamponare la soluzione alcalina, anche quella di abbassare il peso specifico della soluzione onde favorire la sedimentazione degli eventuali bacilli;
- 5) Centrifugare a 3500 rpm per 15(quindici) minuti in centrifuga refrigerata a 4°C.Cio' consente anche di aumentare la velocità a 4000 rpm ma vi sono rischi di rottura dei provettoni!
- 6) Terminata la centrifugazione , lasciare riposare , senza aprire il tappo , durante 5 (cinque) minuti , al fine di evitare formazione di aerosol ;
- 7) Eliminare attentamente il sovrnatante in un dispositivo speciale a tenuta stagna , contenente fenolo al 5%;
- 8) Risospendere il sedimento con l'ausilio di una pipetta ancora in tampone fosfato;
- 9) Sarebbe preferibile per una perfetta tamponatura , riempire di nuovo provettone con tampone fosfato , agitare e ritornare al punto 5
- 10) Per la semina , si imbeve un tampone sterile nel sedimento neutralizzato e si semina in due tubi di Lowenstein-Jensen. Oppure si prelevano circa 200 µL di sedimento e si seminano nei tubi LJ. La semina di routine è realizzata in provette inclinate che contengono il mezzo di Lowenstein-Jensen e, come metodo alternativo, si utilizza la coltura in bottiglie del sistema Bact/Alert 3D[®] (Organon-Teknika).In questo ultimo caso si usano 500 µL di sedimento risospeso che si raccolgono e iniettano con una siringa sterile. Nel caso si sia seminato nei terreni solidi Lowenstein Jensen , fare assorbire il sedimento nei provettoni in posizione orizzontale per almeno una notte, previa eliminazione dell'acqua di condensa.

INOCULO DELLE BOTTIGLIE MT (SISTEMA BACT/ALERT 3D) :

- 1) Si addiziona con una siringa, 0,5 ml di soluzione antibiotica che ha un colore rosso vermiglio (il colore serve a vedere se si è aggiunto o meno la miscela di antibiotici);
- 9) Iniettare con una siringa 0,5 ml del campione concentrato preparato precedentemente;
- 3) le Bottiglie hanno una etichetta con codice a barra rimovibile .Questa etichetta va tolta e messa sul foglio di lavoro dove troviamo l'anagrafica del paziente;
- 4) Fare leggere il codice a barre che si trova lungo la bottiglia, dal lettore ottico dell'apparecchio, dopo aver toccato lo schermo del tipo *touch*-screen, per seguire le procedure contenute nel manuale .Inserire la bottiglia nell'apposito vano dopo aver aperto uno dei moduli di incubazione e lettura.

L'apparecchio segue l'eventuale sviluppo di CO₂ dalla brodocoltura nel tempo.Attenzione : le positività entro i primi 10 giorni sono indice di inquinamento.Trasferire con una siringa

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

delle gocce della bottiglia sospetta in terreni di coltura all'Agar per dimostrare l'eventuale sviluppo di batteri o lieviti contaminanti. Scartare la bottiglia inquinata.

INTERPRETAZIONE:

➤ Coltura (+): trapiantare in provette solide di Lowenstein Jensen per il saggio della sensibilità agli antibiotici previa esecuzione di una colorazione di Ziehl-Neelsen.

➤ Coltura (-): eliminare la provetta solida negativa dopo una incubazione di 35 giorni o anche di più se si sospetta la presenza di micobatteri atipici.

COLTURA DEI MICOPLASMI GENITALI:

Il settore di Batteriologia del nostro laboratorio dispone della metodologia Mycoplasma IST[®] (BioMérieux) per la coltura dei micoplasmi genitali. L'antibiogramma per i micoplasmi è realizzato in mezzi specifici, che contengono gli antibiotici da testare (sia l'identificazione, che la carica, che l'antibiogramma avvengono nello stesso kit).

I campioni clinici che si possono usare con questo kit sono l'urina del primo getto, liquido seminale e secrezioni genitali.

Dopo la raccolta, il materiale deve essere immediatamente collocato nel mezzo di trasporto specifico e inviato il più rapidamente possibile, potendosi conservare in frigorifero a 8°C fino all'invio in laboratorio. Il mezzo di trasporto utilizzato contiene una formula specifica per i micoplasmi, non si devono usare altri mezzi di trasporto.

La coltura è realizzata in mezzi altrettanto selettivi e specifici per i micoplasmi, questo è un ottimo screening dei campioni; ai positivi è associato il profilo antibiotico. Per la diagnosi di infezione sono considerati positivi titoli maggiori o uguali a 10⁴ UFC (unità cambianti colore).

SEMINA DI ROUTINE: I campioni destinati alla coltura dei micoplasmi genitali devono essere, obbligatoriamente, inviati al settore di microbiologia per il proseguimento delle analisi. All'arrivo al settore, i campioni sono trattati in questo modo:

SCREENING:

Urina del primo mitto: centrifugare per 10 minuti a 2000 rpm, raccogliere 100 µL di sedimento e inoculare nella boccettina del kit Mycoplasma IST[®] (Bio-Mérieux);

Sperma: inoculare 100 µl nella boccettina.

Fluido vaginale: idem

Secrezione/raschiato uretrale: inoculare la boccettina dello screening con il tampone usato per la raccolta del materiale, girando vigorosamente dentro la boccettina. Quando si ritira lo stesso, si fa pressione contro le pareti della boccettina, eliminando tutto il liquido in eccesso che rimane nella punta del tampone.

Prendere quindi con una pipetta Pasteur un certo quantitativo dalla boccettina screening e trasferire 2 gocce in ogni pozzetto della striscia. Al termine si aggiungono 2 (due) gocce di olio minerale sterile e si incuba in termostato a 37°C per 1-2 giorni. Nel caso il risultato sia dubbio fino a 5 (cinque) giorni. Il resto del brodo contenuto nella boccettina si conserva in frigorifero.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

7	Calcoli
	Non Applicato

8	Controllo di Qualità
----------	-----------------------------

Settimanalmente sono inoculati batteri con profilo fenotipico conosciuto per la verifica della efficacia dei mezzi di coltura utilizzati.

9	Valori di Riferimento, Interpretazione, Valori Critici
----------	---

Valore di riferimento (della coltura in generale) : assenza di crescita di microorganismi patogeni.

Interpretazione delle colture di screening e antibiogramma dei Micoplasmi urogenitali

LETTURA:

	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
Intenso cambiamento di colore	Rosso- arancio Urea (+)	Rosso arginina (+)

ANTIBIOGRAMMA: Dopo che lo screening è positivo per i Micoplasmi urogenitali, si osservano i pozzetti con gli antibiotici

INTERPRETAZIONE:

	N° della cupola	POSITIVO	NEGATIVO	INTERPRETAZIONE
Identificazione	1 0 2 Uu 3 Mh	Rosso	Giallo	Uu o Mh Uu Mh
Conta delle colonie	4 Uu $\geq 10^4$ 5 Mh $\geq 10^4$	Rosso	Giallo	Uu $\geq 10^4$ UTC Mh $\geq 10^4$ UTC
Antibiogramma	6 DOX 4 7 DOX 8 8 JOS 2 9 JOS 8 10 OFL 1 11 OFL 4 12 ERY 1 13 ERY 4 14 TET 4 15 TET 8	Rosso	Giallo	I ceppi saranno: (-) (-) sensibile (+) (-) intermedio (+) (+) resistente

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

	16 PRI 2	Rosso	Giallo	(-) sensibile (+) resistente
--	----------	-------	--------	---------------------------------

Uu = *Ureaplasma urealyticum* /// Mh = *Mycoplasma hominis* /// UTC = unità cangianti colore

DOX = Doxiciclina // TET = Tetraciclina // JOS = Josamicina // OFL = Ofloxacina //

ERY = Eritromicina // PRI = Pristinamicina

10 Linearità e Limite di sensibilità

Non Applicato

11 Limitazioni del metodo

Paziente sotto terapia con antibiotici, raccolta impropria , temperatura di incubazione differente da 37°C.

12 Referenze Bibliografiche

1. Baron, EJ; Pererson, LR; Finegold, SM (eds): Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. CV Mosby, St. Louis, 1994.
2. Bartholomew, J W; Finkelstein, H: Relationship of cell wall staining to Gram differentiation, *J Bacteriol* 75:77, 1958.
3. Difco: Difco Manual - dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10th ed., 1984.
4. Koneman, EW; Allen, SD; Schreckenber, PC; Winn, WC (eds): Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. JB Lippincott, Philadelphia, 1992.
5. Merck: Manual de medios de cultivo. 1994.
6. Murray, PR; Baron, EJ; Pfaller, MA; Tenover, PC; Tenover, RH (eds): Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1995.
7. Pennington, JE (ed): Respiratory Infections: Diagnosis and Management. 3rd ed. Raven Press, New York, 1994.
8. Woods, GL; Washington, JA: The Clinician and the Microbiology Laboratory. In: Mandell, GL; Bennett, JE; Dolin, R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. Churchill Livingstone, New York, 1995.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.