

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Esame culturale del tampone faringo- tonsillare per la ricerca degli Streptococchi beta emolitici	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1- Principio del test

Semina dell'essudato faringeo o tonsillare , raccolto tramite apposito tampone, per la ricerca dello streptococco emolitico di gruppo A, principale agente di faringiti acute batteriche.

2- Applicazione clinica

La coltura del tampone faringeo resta la metodologia standard per documentare la presenza di uno streptococco di gruppo A nell'orofaringe e per confermare la diagnosi di faringite streptococcica acuta. L'esame colturale su piastra di agar contenente il 5% di sangue di montone ha una sensibilità del 90-95%. La faringite streptococcica è caratterizzata da dolore faringeo, gonfiore, eritema accompagnata da febbre e adenopatia cervicale anteriore.

Sequela suppurative della faringite streptococcica risultano dalla diffusione dell'infezione a tessuti contigui o mediante diffusione batteriemica. Sequela non suppurative includono la febbre reumatica e la glomerulonefrite acuta.

Bisogna chiaramente distinguere fra tampone faringeo richiesto in corso di faringite e tampone faringeo per la ricerca di altri germi. Nel primo caso non va ricercato *Staphylococcus aureus* , i batteri gram negativi , la Candida e altri microorganismi che non causano faringite primaria. In molti laboratori la coltura di routine della gola non è inclusa nel menu dei test , offrendo solo uno screening per lo streptococco.

2- Campione

Essudato faringeo raccolto mediante tampone sterile in Dacron

4- Standard, Controlli, Reagenti

-tampone sterile in Dacron

Il dacron è una fibra sintetica con minore attività inibente, per la maggior parte dei microorganismi, rispetto ad altri materiali (p.e. cotone o alginato di calcio)

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

Se il tampone può essere trasportato al laboratorio entro 2 ore, non è necessario utilizzare alcun terreno di trasporto.

Tampone Cultiplast® con mezzo di trasporto

Codice colore:

Blu: mezzo di trasporto di Amies

Verde: mezzo di trasporto di Stuart

Nero: mezzo di trasporto di Amies con carbone

Rosso: mezzo di trasporto di Stuart con carbone

I terreni di trasporto adatti allo scopo 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, permette 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 più di 3 giorni.

-terreni di coltura

AGAR COLUMBIA 5% SANGUE DI MONTONE:

Mezzo usato per l'isolamento di germi non particolarmente esigenti.

FORMULA: il peptone di carne e caseina permette risultati superiori a quelli ottenibili con le basi per agar sangue normali: streptococchi, stafilococchi, neisserie ed emofili coltivano in modo più rapido ed abbondante e le reazioni emolitiche sono più nette. L'aggiunta del 5% di sangue defibrinato, sterile, di montone serve ad evidenziare le reazioni eventuali di emolisi completa o meno. La concentrazione è quella ottimale per evidenziare l'emolisi in quanto concentrazioni maggiori determinano aloni piccoli e poco evidenti di emolisi, mentre una concentrazione minore determina aloni di emolisi poco chiari.

COMPOSIZIONE: vedi Manulae Biolife III edizione.

INTERPRETAZIONE: Colonie piccole incolori o grigiastre con un alone completo di emolisi e largo (almeno il doppio del diametro delle colonie), fanno sospettare l'isolamento di streptococchi emolitici. Colonie grandi, giallastre, con alone di emolisi stretto, catalasi positive e gram +, fanno sospettare la presenza di stafilococchi.

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

Colonie biancastre con alone di emolisi stretto, gram negative , fanno sospettare la presenza di enterobatteriacee. L'alone grande di emolisi , nel caso degli streptococchi, è presente quando le condizioni di incubazione sono anaerobiche. In caso di incubazione in condizioni normali, l'alone può essere stretto per l'azione della sola emolisina ossigeno stabile.

AGAR COLUMBIA 5% SANGUE DI MONTONE CNA:

Columbia CNA Agar base è preparato con la stessa formulazione del terreno Columbia Agar Base con aggiunti 10 mg/litro di colistina e 15 mg/litro di acido nalidixico per inibire la flora Gram negativa .Il terreno è utilizzato con l'aggiunta del 5% di sangue defibrinato di montone per l'isolamento dei cocci Gram positivi e per l'evidenziazione delle loro proprietà emolitiche.

COMPOSIZIONE: vedi Manulae Biolife III edizione.

6- Procedimento Dettagliato

PREPARAZIONE DEL PAZIENTE

1) Il paziente deve piegare leggermente il capo indietro e respirare profondamente

2) Abbassare la lingua con un apposito depressore in modo da evidenziare le fosse tonsillari e il faringe posteriore.

3) toccare con il tampone sterile la faringe posteriore, tonsille e le aree infiammate. Attenzione a non toccare le pareti laterali della cavità boccale o la lingua in modo da minimizzare la contaminazione con i batteri contaminanti. Il fare emettere dal paziente una lunga "a" serve a sollevare l'ugola e a prevenire la chiusura della bocca .gagging

I tamponi faringei sono contro indicati in pazienti con epiglottide infiammata. I tamponi per ricerca di neisseria gonorrhoeae devono essere posti nel terreno di trasporto contenete carbone e piastrati entro 12 ore .

PROCEDURA DI INOCULO

Ogni parte del tampone deve essere posta in contatto con la superficie dell'agar. Per contro, per non sovrainoculare la piastra , occorre limitare l'area di inoculo a solo un sesto dell'intera superficie della piastra. La sovracrescita di flora commensale costituisce il principale fattore limitante la sensibilità dell'esame colturale.

-Utilizzando la punta del tampone , tracciare una linea diretta dal margine della piastra verso il centro della stessa; la linea dovrebbe essere lunga all'incirca la metà del raggio. Successivamente, inoculare le superfici laterali del tampone facendolo rotare fra le dita.

-con l'ansa batteriologica sterile, tracciare 4-5 strisce di isolamento partendo dall'area inoculata.

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

- ruotare di un quarto la piastra e ripetere l'operazione , senza sterilizzare né cambiare l'ansa , avendo cura di incrociare il settore di primo isolamento solo con le prime 2 o 3 strisciate ed effettuandone altre 2 o 3 senza piu' incrociare il primo settore.
- ruotare di un ulteriore quarto la piastra e ripetere l'operazione descritta al punto 3
- ruotare ancora la piastra di un quarto e ripetere una ultima volta l'operazione di cui al punto 3, terminando questa volta con una breve seropentina direttamente verso il centro della piastra
- infine , senza sterilizzare l'ansa utilizzata, eseguire alcune infissioni in diversi punti della piastra. Infatti in caso di incubazione in atmosfera diversa dall'anaerobiosi stretta, si aumentano in questo modo le possibilità di evidenziare la presenza di una emolisina labile all'ossigeno.

TEMPO DI INCUBAZIONE:

La piastra va incubata a 35-37 °C per 18-24 ore .Deve essere ricercata specificatamente ed esclusivamente la presenza di una emolisi completa delle emazie. Le piastre che non mostrano evidenza di beta emolisi devono essere reincubate per altre 24 ore. Un ottimo terreno selettivo è l'agar sangue 5% con aggiunta di SXT (trimetoprim –

SMZ). L'incubazione in anaerobiosi accresce il rilevamento di ceppi di streptococco emolitico di gruppo A che producono solo streptolisina O ossigeno labile . Anche poche colonie devono essere prese in considerazione in quanto la relazione fra bassa carica batterica e stato di portatore non è stata dimostrata. Inoltre la presenza di poche colonie su una piastra, può riflettere una inadeguata raccolta del campione .
Morfologia delle colonie

Su agar sangue non selettivo le colonie di *S. pyogenes* hanno in genere diametri superiori a 0.5 mm dopo 24 ore di incubazione; tale diametro viene raggiunto solo dopo 48 ore se si utilizzano piastre di agar sangue selettivo. Il colore della colonia varia da grigio a biancastro. L'aspetto è trasparente o traslucido. La beta emolisi è una completa chiarificazione del terreno (per lisi delle emazie). Questa reazione può essere poco evidenziabile per inibizione della streptolisina O da parte dell'ossigeno o dei perossidi prodotti dagli streptococchi durante la crescita in aria o in presenza di CO₂; per questo motivo la beta emolisi è determinata in modo più accurato dopo incubazione in anaerobiosi o nell'area delle infissioni praticate nell'agar o sotto il vetrino coprioggetto .

TEST DI IDENTIFICAZIONE

-Test preliminare

Effettuare il test della catalasi

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

Reagente:ID color catalase Biomerieux

La ricerca della catalasi è un test importante nell'ambito della identificazione batterica. Questo enzima permette la distruzione dei perossidi tossici formati durante le reazioni di ossidazione:



L'evidenza di un ceppo batterico "catalasi positivo" è realizzata in presenza di acqua ossigenata, con l'osservazione, di un evidente sviluppo di ossigeno nascente.

Il reattivo ha una soluzione di acqua ossigenata a 10 volumi (3%).

Il test viene fatto su vetrino depositando 1 goccia di ID color catalase. Si disperde una colonia con una ansa.

La presenza dell'enzima catalasi determina lo sviluppo, in pochi secondi, di bolle di ossigeno che formano una schiuma persistente grazie all'agente imprigionante le bolle di gas del reattivo.

Non fare questo test sulle colonie nella piastra di agar sangue in quanto i globuli rossi contengono una catalasi.

Ricordiamo lo schema classico:

	Staphylococcus Micrococcus	Streptococcus	Corynebacterium	Listeria
Catalasi	+	-	+	+

-Test sierologico

E' il metodo classico di gruppaggio degli streptococchi secondo la classificazione di Lancefield. Questa si basa sulla estrazione di antigeni solubili della parete e la identificazione mediante anticorpi specifici.

Kit : Strepto group test Sclavo diagnostics Cat. No. 87315

Il metodo Sclavo in uso consente utilizzare una procedura chimica semplice che consente di identificare i gruppi A, B, C, F e G senza reazioni crociate. Il limite di questo test riguarda gli streptococchi emolitici di gruppo D che richiedono un ulteriore passaggio di estrazione enzimatica.

-Raccolta del campione

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

Per una corretta identificazione è importante ottenere colonie ben isolate su agar sangue. Prima dell'analisi sierologica è importante ottenere colonie bene isolate su agar sangue. Prima dell'analisi sierologica, è consigliabile osservare l'attività emolitica ed allestire un vetrino con la colorazione di Gram per assicurarsi della purezza del ceppo da esaminare.

Procedura

Controllo Qualità

Usare il controllo positivo e soluzione fisiologica come se fossero estratti di un campione. L'assenza di reazioni positive e negative è indice di alterazione dei reattivi e/o dei controlli.

Reagenti

Reattivo estraente 1: soluzione di soio nitrito

Reattivo estraente 2: soluzione di acido acetico

Reattivo estraente 3: soluzione di ammonio carbonato

Reattivo estraente E: Lisozima in tampone pH 8.2 $\pm$ 0.2, liofilizzato. Sciogliere prima dell'uso con 2 mL di acqua distillata sterile.

I lattici A,B,C,D,F, G sono lattici sensibilizzati con anticorpi di coniglio anti streptococchi dei rispettivi gruppi.

Controllo positivo

Liofilizzato di antigeni di streptococchi dei gruppi A,B,C, D, F e G in soluzione fisiologica. Sciogliere prima dell'uso in 1 mL di acqua distillata sterile.

Tecnica con estrazione chimica

1. Trasferire 50 uL (una goccia) di Reattivo estraente 1 in una provetta.
2. Prelevare 5-6 colonie con un ago, prestando attenzione a non raccogliere parte del terreno di coltura, e stemperarele sul fondo della provetta.
3. Aggiungere 50 uL (una goccia) di Reattivo estraente 2.
4. Lasciare a riposo per almeno 5 minuti ma non più di 10 minuti. Un tempo di estrazione prolungato diminuisce la sensibilità del test.
5. Aggiungere 100 uL (2 gocce) di Reattivo estraente 3 e mescolare. Utilizzare entro un quarto d'ora.
6. Risospendere il reattivo al lattice da usare prima testando il lattice A, quindi il Lattice B e C poi gli altri.

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

7. Trasferire una goccia del lattice in una cella del cartoncino. Ripetere su cellette diverse per gli altri eventuali lattici da usare.
8. Aggiungere 25 uL di estratto antigenico in ogni celletta.
9. Usare una bacchetta pulita per ogni celletta, miscelare la reazione accuratamente.
10. Roteare il cartoncino. Al termine di 1 minuto, osservare ciascuna celletta per accertare la presenza o meno di una evidente agglutinazione. Agglutinzioni successive sono da considerarsi aspecifiche.

In caso di risultati negativi, procedere con la tecnica per la identificazione degli streptococchi di gruppo D.

Tecnica con estrazione enzimatica .Permette di identificare piu' del 95% degli streptococchi di gruppo D:

1. Trasferire, dopo ricostituzione , 100 uL di Reattivo estraente E in una provetta.
2. Prelevare 4-5 colonie con un ago, prestando attenzione a non raccogliere parte del terreno di coltura, e stemperarle sul fondo della provetta.
3. Incubare a 37°C per 10 minuti.
4. Tenendo il contagocce verticalmente, aggiungere una goccia di lattice D in una celletta di cartoncino.
5. Aggiungere 25 uL di estratto antigenico alla celletta.
6. Usando una bacchetta pulita, miscelare la reazione accuratamente. Scartare le bacchette usate.
7. Roteare il cartoncino. Al termine di un minuto, accertare la presenza di agglutinazione. Agglutinzioni successive sono da considerarsi aspecifiche.

Interpretazione dei risultati

Tecnica con estrazione chimica

Positivo: per la presenza di antigeni dei gruppi A,B,C,F o G: agglutinazione nella celletta del campione in esame con i lattici A,B,C,F o G.

Negativo: per la presenza di antigeni dei gruppi A, B, C, F o G: nessuna agglutinazione nella celletta del campione in esame con i lattici A,B,C,F o G.

Tecnica con estrazione enzimatica

Positivo per la presenza di antigene del gruppo D: agglutinazione nella celletta del campione in esame con il lattice D.

Negativo per la presenza di antigene del gruppo D: nessuna agglutinazione nella celletta del campione in esame con il lattice D.

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

-Caratteristiche del metodo

Sensibilità

L'identificazione con la tecnica con estrazione chimica dei gruppi A,B,C, F e G degli streptococchi, eseguita sia su ceppi liofilici di collezione sia su isolati clini, ha dato una sensibilità del 98%.L'identificazione del gruppo D con la tecnica dell'estrazione enzimatica ha dato una sensibilità del 92%.

PROCESSAMENTO FINALE

Test di sensibilità agli antibiotici

La penicillina rimane il farmaco di scelta per il trattamento di infezioni sostenute da *S. pyogenes*. Le cefalosporine e l'eritromicina costituiscono alternative valide in pazienti allergici alla penicillina. Infezioni gravi sostenute da *S. pyogenes* possono probabilmente essere trattate con una associazione di penicillina e clindamicina. Mentre la sensibilità alla penicillina (ed ai beta lattamici in genere), rimane costante in *S. pyogenes*, sono state segnalate percentuali variabili di resistenza alla eritromicina ed alla clindamicina. Per questo l'antibiogramma deve essere eseguito routinariamente per l'eritromicina e la clindamicina e per tutti i nuovi macrolidi quali l'azitromicina, la rokitamicina e la claritromicina.

Antibiogramma secondo il metodo di Kirby –Bauer

La tecnica raccomandata dall'NCCLS è quella dell'agar diffusione su dischetto, su piastre di Muller-Hinton agar con 5% di sangue di montone. L'inoculo richiede una sospensione preparata dalla coltura, con una torbidità pari allo standard 0.5 Mc Farland.

Antibiotico	dischetto	Diametro dell'alone in mm		
		Resistente	Intermedio	Sensibile
Eritromicina	15 ug	<15	16-20	> 21
Penicillina	10 U			> 28
Clindamicina	2 ug	< 14	15-20	> 19

SICUREZZA DELL'OPERATORE

7- Calcoli

Non applicati

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

8- Controllo di Qualità

E' possibile controllare le performances dei terreni utilizzando ceppi microbici di riferimento. Consultare le norme NCCL M22.

9- Valori di Riferimento, Interpretazione, Valori critici

Valori di Riferimento: Non sviluppo di batteri o lieviti

10- Linearità e limite di rilevamento

.

11- Limitazioni del metodo

Paziente sotto antimicrobici , raccolta di sangue impropria, mancata osservanza delle regole descritte anteriormente.

12- Referenze Bibliografiche

Bisno , A.L., M.A., Gerber , J.M., Gwaltney, E.L. Kaplan, and R.H. Schwartz.1997.Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis:a practice guideline.Clin.Infect.Dis. 25:574-583.

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