

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Esame colturale liquido sinoviale	Nov. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1.1. Sinonimi

Esame colturale liquido sinoviale, esame colturale materiali vari (quando non è specificato se non a voce che si tratta di liquido sinoviale).

1.2. Principio del test

Inoculazione del liquido sinoviale in bottiglie da emocoltura o direttamente su terreni solidi dopo centrifugazione, per l'isolamento e identificazione dei più comuni patogeni di artrite settica e infezione delle protesi.

1.3. Significato clinico

L'analisi del liquido sinoviale è una procedura di routine per la diagnosi di artrite. In particolare serve a differenziare fra artrite infiammatoria e non infiammatoria. La procedura raccomandata include la valutazione dell'aspetto del fluido sinoviale, la conta cellulare, la microbiologia cioè l'esame colturale che ci riguarda, i test biochimici quali il livello di glucosio, LDH, proteine. L'esame batteriologico dell'aspirato sinoviale (*joint fluid*) è importante nella diagnosi dell'artrite settica. Il tasso di mortalità per artrite settica rimane alta (circa 10%) nonostante l'uso di antibiotici, il rischio è soprattutto per i pazienti anziani e quelli con infezioni della articolazione dell'anca. I batteri possono penetrare la sinovia o per via ematogena, o dalle ferite o da manovre di artroscopia (quest'ultima origine è però rarissima) o da iniezioni intra articolari. Il ginocchio è il più comune sito negli adulti. Nei bambini l'anca è più frequente. L'interessamento poli articolare è raro. Il paziente è febbrile e ha una limitazione nei movimenti. L'artrite gonococcica è accompagnata da sintomi genito-urinari. Frequente la febbre e le lesioni della pelle. L'artrite tubercolare è una artrite cronica monoarticolare. L'artrite da micobatteri non tubercolari è acquisita da lesioni cutanee ed è indistinguibile dalla tubercolosi. L'artrite associata alla malattia di Lyme è caratterizzata da attacchi mesi o anni dopo la puntura di una zecca infetta.

1.4. Campione

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

Il campione è l'aspirato dell'articolazione prelevato in condizioni asettiche e possibilmente prima che si sia instaurata una terapia antibiotica con aggiunta di eparina. L'aspirato è comunemente purulento, lattiginoso, verde-giallo o grigiastro. Il fluido sinoviale settico mostra un alto livello di leucociti con più del 90% PMN.

1.5. Modalità di conservazione e trasporto

Il fluido sinoviale, come tutti i liquidi biologici sterile, va inviato in contenitore sterile, possibilmente direttamente in siringa. Nel caso si invia un tampone questi deve essere inviato in terreno di trasporto.

I più comuni mezzi di trasporto sono presenti nei tamponi sterili a base di Dacron.

Il Dacron è una fibra sintetica con minore attività inibente, per la maggior parte dei microorganismi, rispetto ad altri materiali (p.es. cotone o alginato di calcio = calgi) 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 più 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. Nel terreno di Amies i gonococchi sopravvivono per 12 ore a temperatura ambiente.

1.6. Strumentazione

Non applicabile

1.7. Metodologia

L'esame diretto mediante colorazione di Gram ha una sensibilità del 50% nel caso di infezione non gonococcica (principalmente *Staphylococcus aureus* e streptococchi)

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

L'esame colturale del fluido sinoviale ha una sensibilità del 67%. Si raccomanda anche la concomitante emocoltura. La sensibilità e specificità sono più alte per infezioni non gonococciche. È importante che non si sia instaurata una terapia antibiotica precedente al prelievo. È importante l'uso di bottiglie da emocoltura soprattutto bottiglie bifasiche tipo Hemoline®. Il volume di inoculo deve essere piuttosto alto perché questo aumenti le probabilità di una coltura positiva. Il volume deve essere minimo 5 ml. Ma anche le bottiglie del tipo Aerobic FAN per l'apparecchio Bact/Alert®, data la presenza di resine chelanti gli antibiotici, possono essere prese in considerazione.

Test biochimici

Glucosio, complemento, fattore reumatoide, proteine, LDH

Conta leucociti totale

Leucociti < 2000/mm³ fluido sinoviale non infiammatorio

Leucociti > 2000/mm³ fluido sinoviale infiammatorio

Batteri comunemente interessati alla infezione dell'articolazione

<i>Staphylococcus aureus</i>	Circa il 60% dei casi. Dalla pelle
<i>S. epidermidis</i>	Dalle protesi
<i>Streptococcus group A</i>	Circa il 20% dei casi. Dalla pelle e tessuti molli
<i>S. group B</i>	Neonati
<i>Propionibacterium acnes (a)</i>	Da iniezione intra articolare
<i>M. tuberculosis</i>	
<i>M. avium intracellulare</i>	
<i>M. kansasii, M. marinum</i>	
<i>Escherichia coli</i>	Dal tratto urinario negli anziani
<i>Kingella kingae</i>	Dal tratto respiratorio o buccale nei bambini
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Brucella melitensis</i>	Latte non pastorizzato
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Rapporti sessuali
<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Bacteroides fragilis (a)</i>	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	

(a) batteri anaerobi

1.8. Reagenti Utilizzati

1.8.1 Reagenti, concentrazioni

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

Per l'esame colturale del fluido sinoviale, come per gli altri fluidi biologici sterili è consigliabile, in prima battuta usare una bottiglia da emocoltura per aerobi tipo Hemoline® o Aerobic FAN del Bact/Alert® che ha il vantaggio di avere le resine per la rimozione degli antibiotici, inoltre questi terreni sono in grado di far crescere germi "difficili" quali *Haemophilus* e *Neisseria*.

Per i terreni solidi da usarsi in seconda battuta per il trapianto da crescita nei precedenti terreni useremo o sul sedimento del fluido sinoviale centrifugato a 2000 rpm x 5 minuti usiamo:

AGAR SANGUE 5% SANGUE DI MONTONE :

Si usa come base il Muller Hinton o la base Columbia a cui si addiziona il 5% di sangue defibrinato di montone (preferibilmente). Ha un colore rosso caratteristico. La sua abbondante base nutritiva offre condizioni ottimali di crescita. Il valore di pH di 6.8 è specialmente favorevole alla conservazione degli eritrociti e per la formazione di aloni di emolisi ben chiari.

AGAR MacCONKEY:

Agar selettivo per l'isolamento degli enterobatteri, dal nome del suo inventore MacConkey (1905). I sali biliari e il cristal violetto inibiscono la flora Gram (+). Il lattosio, assieme all'indicatore di pH rosso neutro, serve per evidenziare la fermentazione di questo zucchero.

Composizione : peptone di carne, peptone di caseina, NaCl, lattosio, miscela di sali biliari, rosso neutro, cristal violetto, agar.

Interpretazione: Colonie lattosio (-) sono incolore e le colonie lattosio (+) sono rosse, con un alone torbido, dovuto all'abbassamento di pH e precipitazione dei sali biliari.

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* saprofiti e altri batteri. 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): Proteose-peptone: 15.0 gr, Amido di mais : 1.0 gr., Fosfato dipotassico: 4.0 gr, Diidrofostato potassico: 1.0 gr., Cloruro di sodio: 5.0 gr, Emoglobina: 10.0 gr, Integratore IsoVitaleX : 10.0 ml, Agenti selettivi: 12.0 ml, Pimaricina: 0.48 gr., Agar: 13.5

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.

1.8.1 Magazzino e stabilità dei reagenti

Se preparati in laboratorio , i mezzi di coltura devono essere tenuti in frigorifero (4-8 °C) , avvolti in buste di plastica per evitare la rapida disidratazione.. In questo modo, i terreni preparati in laboratorio hanno una validità di 14 giorni.Le piastre di Agar sangue e di Agar cioccolato vanno tenute in frigorifero.Le bottiglie per emocoltura e gli altri terreni solidi vanno conservati a temperatura ambiente inferiore a 20°C.

1.9. Procedimento dettagliato

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

Il fluido sinoviale va in parte inoculato direttamente in una bottiglia da emocoltura Hemoline® che è un terreno bifasico del tipo Castaneda. Si può inoculare anche nelle bottiglie per il Bact/Alert® del tipo Aerobic FAN. Metà dei campioni da pazienti sottoposti ad antibiotici crescono solo usando bottiglie per emocoltura. La quantità minima sarà di 5 mL. L'incubazione è a 37°C in termostato per almeno 48 ore. La resa delle neisserie è bassa. E' da escludere l'uso del Trypticase Soy broth che oltre a non consentire l'inoculo di un grosso volume, non permette la crescita di *Haemophilus* e *Neisseria gonorrhoeae*, agente dell'artrite gonococcica (un tempo molto diffusa).

-Al ricevimento del flacone Hemoline® inoculato o dopo inoculazione, preincubare il brodo a 35-37°C per un minimo di 4 ore.

-Inondare l'Agar con il brodo inclinando il flacone

-Incubare a 35-37°C in posizione verticale.

Leggere il flacone ogni giorno fino a 4 giorni, ogni giorno rinnovare l'inondazione dello strato di Agar.

-La comparsa di opacità o di emolisi nel brodo, la produzione di gas, la formazione di eventuali depositi sulla superficie del brodo o lo sviluppo di colonie sull'Agar sono indice di positività del campione.

Il volume di liquido sinoviale dovrà essere fra 5mL e 10 mL.

Nel caso di subcultura da brodo e di semina diretta del fluido sinoviale, dopo centrifugazione a 2000-2500 rpm per 2-5 minuti, i terreni di coltura solidi da usare sono:

Terreno	Ricerca	Atmosfera di incubazione	T °C	Tempo
Mc Conkey Agar	Enterobatteri, Pseudomonas	aerobia	37°C	24 ore
Columbia 5% sangue di montone	Germi comuni aerobi, Streptococchi	5% CO2	37°C	24 h
Agar Mannitolo	<i>Staphylococcus aureus</i>		37°C	24 ore
Agar Cioccolato PoliViteX	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5% CO2	37°C	48 h

1.10. Calibrazione della metodologia

Non applicabile

1.11. Controllo di qualità interno

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

Settimanalmente sono inoculati campioni batterici con profili fenotipici conosciuti per verificare l'efficacia dei mezzi di coltura utilizzati. Questi ceppi fanno parte del C.Q. interno Culti-Loops® della Oxoid .

1.12. Criteri per la validazione dei risultati

Supervisione tecnica del responsabile del settore

1.13. Interpretazione e Valori di Riferimento

Non sviluppo di flora batterica e lieviti (NS)

1.14. Linearità

Non applicabile

1.15. Limite di rilevazione

Non applicabile

1.16 Limitazione del metodo

Pazienti che hanno ricevuto terapia antibiotica , impropria raccolta (mancanza di prelievo sterile). Terreni non idonei perché disidratati, scaduti, temperatura di incubazione differente da 35-37°C, eccesso di tempo fra la raccolta del fluido sinoviale e l'arrivo in laboratorio. Se raccolto mediante tampone mancanza di terreno di trasporto o se conservato in terreno di trasporto conservato dopo 12 ore.

6.18. Biosicurezza

Vedi POS sulla Bio sicurezza

6.19. Referenze bibliografiche

Marco A. Cimmino: "Recognition and management of bacterial arthritis" Drugs Jul 1997;54:50-60

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

A.Swan, H. Amer, P. Dieppe: "The value of synovial fluid assay in the diagnosis of joint disease: a literature survey" Ann Rheum Dis, 2002;61:493-498.

Robert W. Ike: "Bacterial arthritis" Current opinion in Rheumatology 1998, 10 :330-334.

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