

C.I. MICROBIOLOGIA E MICROBIOLOGIA CLINICA
CdS Infermieristica – CdS Assistenza Sanitaria
AA 2017-2018

7. DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

Giovanni Di Bonaventura, PhD

Università “G. d’Annunzio” di Chieti-Pescara
Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche
Nuovo Polo Farmacia, corpo D, III livello (tel 0871 3554812)
Centro Scienze dell’Invecchiamento (Ce.S.I.), V livello (tel 0871 541519)
E-mail: gdibonaventura@unich.it

Obiettivi

Obiettivo principale del Laboratorio di Microbiologia Clinica è quello di **fornire la diagnosi eziologica di una malattia infettiva**, ossia di identificare l'agente patogeno responsabile della malattia, **allo scopo principale di suggerire un appropriato trattamento terapeutico**.

La attività del Laboratorio di Microbiologia Clinica è inoltre finalizzata alla:

- **valutazione della efficacia terapeutica** (monitoraggio o follow-up)
- sorveglianza **dell'andamento dell'antibiotico-resistenza**
- **individuazione di «portatori sani»** (potenziale fonte di contagio)

Percorso diagnostico

L'accertamento eziologico di una infezione è il **risultato di un percorso diagnostico che si articola in più fasi:**

■ Fase PRE-ANALITICA:

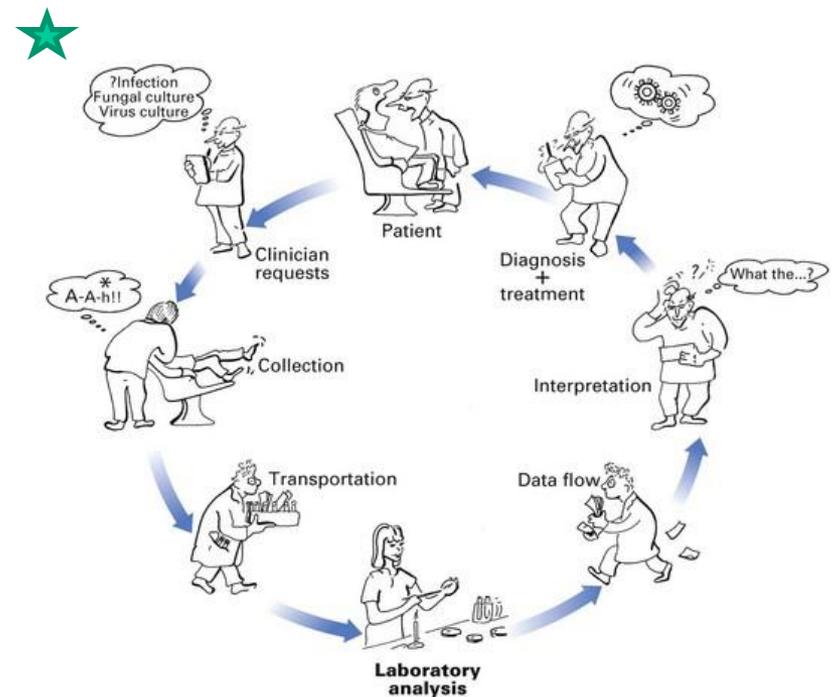
- Richiesta di indagine
- Prelievo del campione
- Conservazione del campione
- Trasporto del campione
- Accettazione del campione

■ Fase ANALITICA:

- Esecuzione dell'esame
- Validazione del risultato

■ Fase POST-ANALITICA:

- Refertazione del risultato
- Elaborazione statistica



FASE PRE-ANALITICA:

**PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL
CAMPIONE CLINICO**

La UO di degenza o la struttura che effettua il prelievo è direttamente responsabile della:

- corretta **raccolta** del campione: in **asepsi**, ossia evitando la contaminazione del campione (flora commensale), «**in sicurezza**», ossia limitando il rischio biologico
- adeguata **identificazione** del campione: deve essere **univoca** (generalmente mediante codice a barre) ed effettuata **PRIMA del trasporto** verso il laboratorio
 - corretta **compilazione del modulo di richiesta** di indagine: **ragionata** (basata sulla preliminare formulazione del sospetto diagnostico da parte del Clinico) e corredata di **informazioni** relative al paziente, il campione e la tipologia di indagine richiesta
- **trasporto** del campione al Laboratorio: secondo **tempi e temperature** adeguate al sospetto eziologico ed al campione

Qualora ciò non fosse possibile, la UO di degenza è anche responsabile della:

- **temporanea conservazione** del campione, secondo **modalità** indicate nei **protocolli** redatti e forniti dal Laboratorio di Microbiologia.

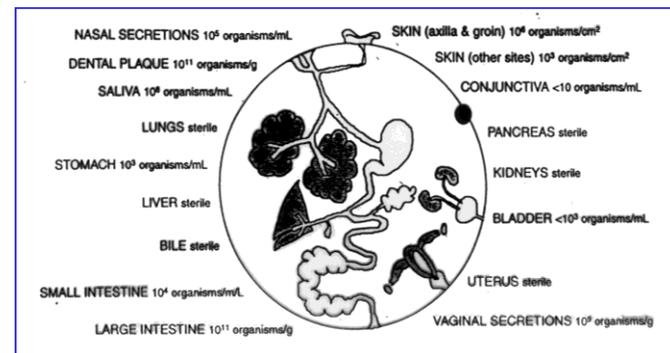
Il Laboratorio di Microbiologia deve assistere la UO di degenza fornendo ai Responsabili dei prelievi, **un manuale di raccolta dei campioni** contenente istruzioni scritte specifiche per la corretta raccolta, trasporto e conservazione del campione.

Fase pre-analitica

Contaminazione del campione

Il campione biologico può essere prelevato da:

- **distretti “sterili”** (non a diretto contatto con l’esterno e, quindi, fisiologicamente sterili):
 - sistema cardiovascolare, sistema nervoso, vescica, ureteri, reni, fegato, milza, tessuti profondi, cavità chiuse, polmoni e bronchi terminali;
 - **ogni isolamento microbico ha significato eziologico (è indicativo di infezione)**
- **distretti “non sterili”** (a diretto contatto con l’ambiente e, quindi, “contaminati” dalla flora microbica residente)
 - cute, congiuntiva, naso-faringe, oro-faringe, orecchio esterno, intestino, retto, vagina, uretra terminale;
 - **difficile interpretazione dei risultati**: richiede una approfondita conoscenza della eziologia dell’infezione e della flora potenzialmente contaminante.



Fase pre-analitica

Prelievo «in sicurezza»



- Ogni campione biologico deve essere considerato come potenzialmente a rischio biologico per la salute degli operatori sanitari.
- Durante la fase della raccolta e del trasporto è infatti possibile, a seguito di inadempienze e/o errori, l'infezione dell'operatore.
- Principali agenti causa di infezioni professionali:
 - **Batteri:** *Brucella* spp., *Burholderia (Pseudomonas) pseudomallei*, *Chlamydia* spp., *Francisella tularensis*, *Leptospira* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. Raramente responsabili: *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Treponema pallidum*.
 - ***Mycobacterium tuberculosis*:** presente nell'escreato, liquido di lavaggio bronchiale, liquido di lavaggio gastrico, liquor, urine, materiale da lesioni caseose. Trasmissione per via aerea. Dose infettante: 1-10 cellule.
 - **Virus dell'epatite B:** presente nel sangue saliva, sperma, secrezioni vaginali. Trasmissione mediante puntura accidentale. Dose infettante: una puntura accidentale con ago può contenere fino a 100 dosi infettanti.
 - **Virus dell'epatite C:** presente nel sangue, saliva e sperma. Trasmissione mediante puntura accidentale. Dose infettante: non nota.
 - **Virus dell'immunodeficienza umana (HIV):** presente nel sangue, saliva, sperma, latte materno, tessuti, liquido amniotico, liquor, liquido sinoviale, liquido peritoneale, liquido pleurico, liquido pericardico. Trasmissione mediante puntura accidentale. Quantità sangue infettante: 100 ul.
 - **Miceti:** *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*
 - **Protozoi:** *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp., *Tripanosoma* spp.

Fase pre-analitica

Prelievo «in sicurezza»

- Le **modalità attraverso cui un operatore può contrarre una infezione** al momento del prelievo/trasporto sono:
 - inalazione (aerosol)
 - inoculazione percutanea (oggetti acuminati)
 - ingestione
 - contatto

- **Durante il prelievo è, quindi, necessario utilizzare i dispositivi per la protezione individuale (DPIs)** atti a contenere il rischio biologico:
 - guanti
 - camice
 - occhiali
 - visiera
 - mascherina



Fase pre-analitica

Misure di contenimento del rischio biologico

- Nei casi in cui si preveda (anche solo accidentalmente) il contatto con sangue o altri liquidi biologici provenienti da qualsiasi paziente, bisogna **adottare delle precauzioni universali per prevenire l'esposizione cutanea, mucosa o parenterale**.
- Consistono:
 - nell'adozione di misure di barriera o **Dispositivi di Protezione Individuale (DPI)**: guanti, camici, maschere, occhiali, schermi facciali protettivi, grembiuli, calzari;
 - nel **corretto uso e smaltimento di oggetti acuminati (es. aghi) e taglienti**;
 - nel corretto **lavaggio delle mani**;
 - nell'immediata **decontaminazione delle superfici** sporche di materiali biologici potenzialmente infetti.



Queste misure sono valide per il contenimento del rischio sia per il PRELIEVO che per il TRASPORTO di un campione

Fase pre-analitica

Trasporto del campione

Il campione deve essere trasportato e consegnato in laboratorio:

- in **contenitori adeguati** (per tipologia di campione clinico e sospetto eziologico), **sterili ed integri**.
- con **modalità che assicurino la massima recovery dei microrganismi patogeni**. In alcuni casi è previsto l'impiego di **sistemi di trasporto** in grado di mantenere vitali i microrganismi.
- **nell'intervallo di tempo** appropriato alla natura dell'esame richiesto; in generale il campione deve essere consegnato **ENTRO le 2 h dal prelievo**. Un trasporto prolungato può favorire la crescita dei contaminanti o ridurre la vitalità del patogeno (es. meningococco, emofili, streptococchi).
- ad una **temperatura adeguata**; **generalmente refrigerato** (2-8°C), in alcuni casi lo si conserva a **temperatura ambiente** (sangue, liquor).
- con **modalità che garantiscano la sicurezza** di tutte le figure coinvolte nel trasporto verso il laboratorio ricevente.



Fase pre-analitica

Trasporto del campione: conservazione

Qualora fosse impossibile inviare rapidamente (entro 2 h) il campione al Laboratorio, la sua conservazione (per max 24 h) deve avvenire secondo le indicazioni fornite dal Laboratorio:

CAMPIONE	CONSERVAZIONE
SANGUE	RT (inoculato in flaconi per emocoltura); se possibile, incubare a 37°C in attesa di trasporto
ESSUDATI, DRENAGGI, LIQUIDI (pericardico, pleurico, asciti articolari, dialisi peritoneale)	Inoculare parte del materiale nei flaconi per emocoltura e conservare a RT . Conservare la restante parte a +4°C
CATETERE	+4°C
ESPETTORATO e/o BRONCOASPIRATO	+4°C
TAMPONI (faringeo, nasale, auricolare, vaginale, congiuntivale, cutaneo, etc.) in sistema di trasporto	RT (+4°C per ricerca <i>Campylobacter</i> , <i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i>)
URINE	+4°C
FECI	+4°C
LIQUOR	RT (+4°C per ricerca virale)
RICERCA MICOBATTERI	+4°C
ESSUDATO (ulcere, piaghe, ferite chirurgiche)	+4°C
BIOPSIE, AGOASPIRATI	+4°C , in fisiologica
RICERCA ANAEROBI in sistema di trasporto	RT

+4°C: conservazione in frigo; **RT**: temperatura ambiente (20-25°C)

Fase pre-analitica

Trasporto “in sicurezza” del campione



- In accordo con la normativa (legge n. 21 del 20.07.94, circolare n. 3, 8 maggio 2003), le linee-guida del Ministero della Salute, OMS ed ISO, **il trasferimento dei campioni biologici verso il Laboratorio deve avvenire “in sicurezza”**, ossia evitando la dispersione del materiale biologico e la eventuale contaminazione di altri materiali, di attrezzature, dei pazienti e del personale che dovrà manipolare il campione stesso:
 - **campione singolo** (provetta, tampone, flacone): in busta di plastica monouso a due scomparti: uno dotato di chiusura a pressione per alloggiare il campione biologico, l’altro per il modulo di richiesta debitamente compilato. Sul fronte del sacchetto sono stampati il simbolo di rischio biologico e le istruzioni.
 - **campioni multipli**: in contenitori rigidi, infrangibili ed a chiusura ermetica. I campioni vanno trasportati in verticale, utilizzando apposite rastrelliere.
- Il Laboratorio ha l’obbligo di monitorare le condizioni “di sicurezza” del trasporto (*ISO 15189*)



Accettazione del campione: conformità

Un **campione può essere accettato dal Laboratorio** di Microbiologia (e quindi entrare nella fase analitica) **soltanto se «conforme»**, ossia se soddisfa una serie di requisiti. Altrimenti, deve essere rifiutato con richiesta di ripetizione di prelievo.

CRITERI DI «NON CONFORMITA'»

▪ **Contenitore:**

- non conforme alle vigenti norme di sicurezza (es. siringhe con ago);
- non adatto al campione;
- non sterile, aperto o danneggiato, con evidente fuoriuscita del materiale.

▪ **Campione:**

- modulo di richiesta mancante od incompleto;
- prelevato in quantità insufficiente;
- evidentemente contaminato da altro materiale (urine con feci, espettorato con saliva).

▪ **Materiale non idoneo per la ricerca:**

- ricerca di gonococco/clamidia in tampone vaginale;
- prelievo in paziente già in terapia antibiotica;
- campioni di tessuto (biopsie, linfonodi) in formalina per ricerca di microrganismi vitali;
- tipologia non adeguata (saliva vs escreato; raccolta urine “delle 24 h” per urinocoltura).

▪ **Impropria conservazione e/o trasporto:**

- terreno di trasporto assente, ove raccomandato;
- trasporto prolungato;
- temperatura non adeguata.

FASE ANALITICA:

TECNICHE DIAGNOSTICHE IN MICROBIOLOGIA

Diagnostica microbiologica

Il microrganismo causa dell'infezione può essere ricercato, in un campione clinico, seguendo tre approcci:

- **DIAGNOSI DIRETTA**, finalizzata a stabilire la presenza dell'agente patogeno, la sua identità e la sua sensibilità agli antibiotici, direttamente nel campione mediante:
 1. esame microscopico
 2. esame colturale (isolamento)
 3. identificazione (a livello di specie)
 4. antibiogramma
- **DIAGNOSI RAPIDA**, utile nelle infezioni gravi in quanto consente la identificazione in tempi brevi mediante:
 - ricerca di antigeni
 - ricerca di sequenze geniche
- **DIAGNOSI INDIRETTA**, il cui obiettivo è di rilevare la risposta immunitaria (anticorpale) dell'ospite all'agente infettivo.

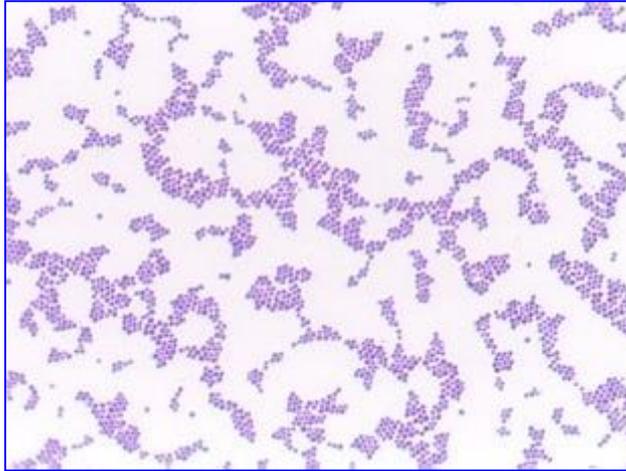
Diagnosi DIRETTA

Esame microscopico

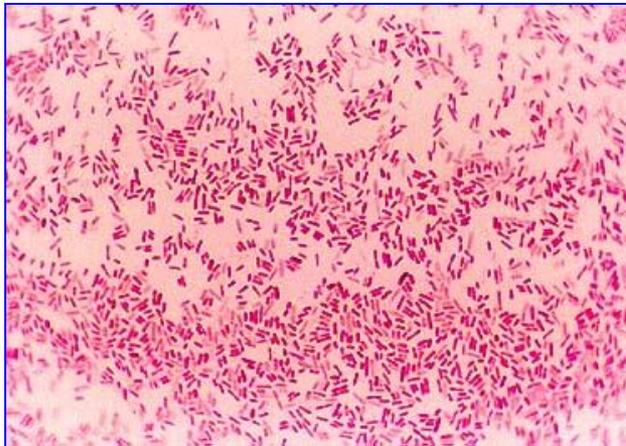
- L'esame microscopico fornisce informazioni utili soprattutto per una **diagnosi presuntiva**, che dovrà poi essere successivamente confermata.
- Il campione può essere osservato:
 - **previa colorazione**, per la ricerca “mirata” di specifici gruppi microbici/patogeni (es. colorazione Gram).
 - “**a fresco**”, ossia non colorato; adatto per la ricerca di microrganismi difficilmente colorabili/coltivabili e per lo studio di alcune proprietà biologiche (forma, organizzazione, motilità, reattività chimica e/o sierologica);
- La scelta della tecnica microscopica da impiegare dipende dal patogeno di cui si sospetta la presenza:
 - microscopia **in campo chiaro** (frequente utilizzo)
 - microscopia **in campo oscuro** (*Treponema pallidum*, causa di sifilide)
 - microscopia **a contrasto di fase** (frequente utilizzo)
 - microscopia **in fluorescenza** (maggiore sensibilità perché si utilizzano anticorpi per la ricerca del microrganismo)

Colorazione di Gram

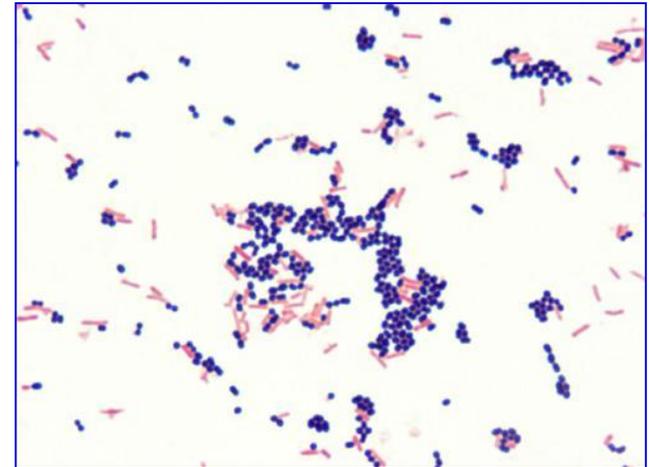
Osservazione microscopica



Staphylococcus epidermidis
(Gram-positivo)



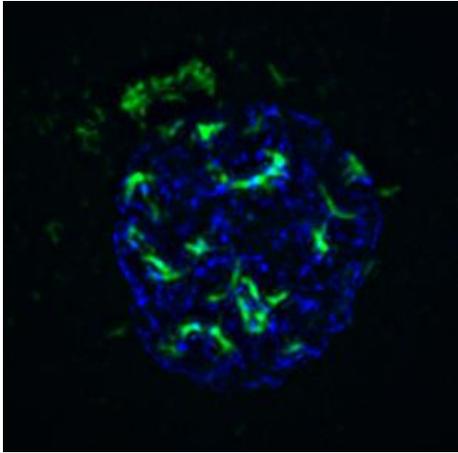
Escherichia coli
(Gram-negativo)



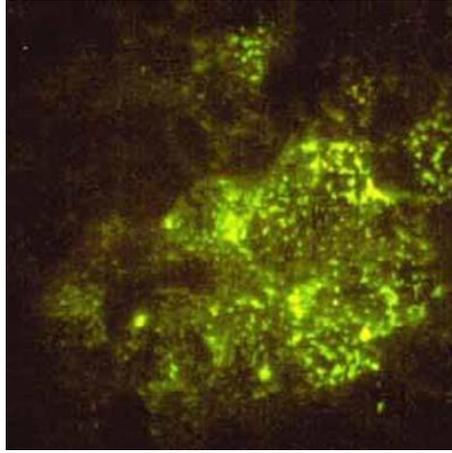
Enterococcus + Escherichia coli
(Gram-positivo + Gram-negativo)

Esame microscopico

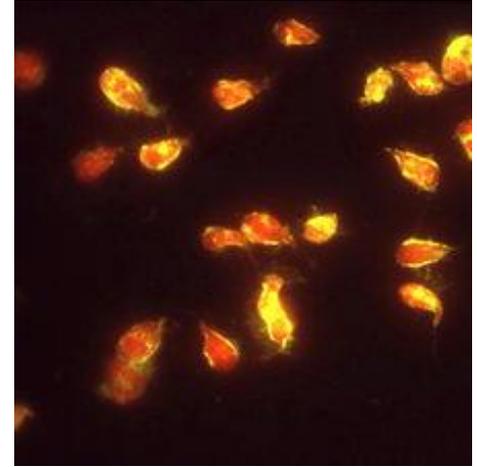
Microscopia in fluorescenza



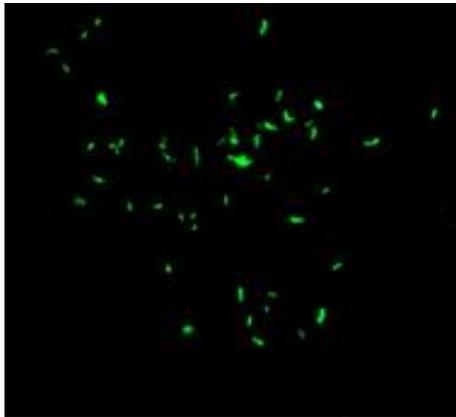
Adenovirus



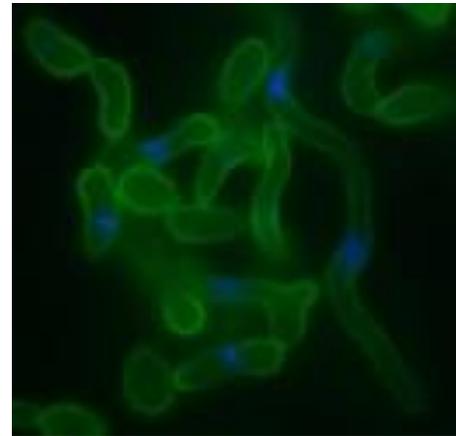
Coronavirus



Giardia intestinalis

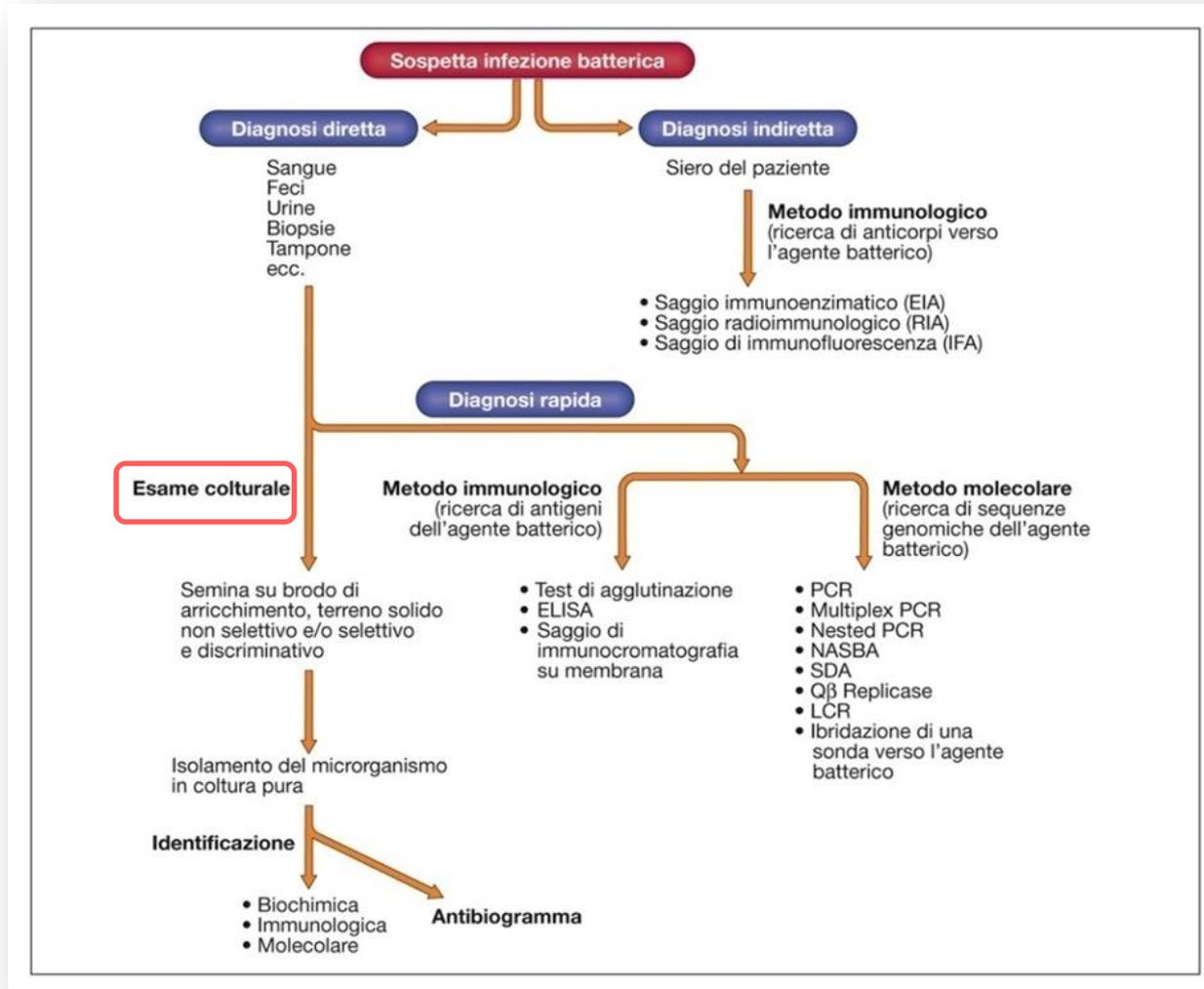


Mycobacterium tuberculosis



Candida albicans

Diagnostica microbiologica



Diagnosi DIRETTA

Esame colturale (isolamento)

L'isolamento colturale è solitamente la tecnica di maggiore impiego nella diagnostica microbiologica. E' considerato essere la tecnica *GOLD STANDARD* in quanto ha:

- **Buona sensibilità:**
 - in teoria, la presenza di una sola cellula vitale può portare ad un isolamento;
 - la maggior parte dei batteri, miceti e protozoi è in grado di crescere in adeguati terreni di coltura; viceversa, i patogeni intracellulari (*Chlamydia*, *Rickettsiae*, virus) possono essere isolati soltanto in colture di cellule eucariotiche.
- **Massima specificità** (100%)
 - la crescita del microrganismo garantisce SEMPRE la presenza dell'infezione

L'isolamento colturale si articola nelle **seguenti fasi** (sequenziali):

1. scelta e preparazione dei terreni di coltura
2. semina del microrganismo
3. incubazione
4. lettura ed interpretazione dei risultati

Diagnosi DIRETTA

Isolamento di batteri e miceti: terreni

Stato fisico: terreni semi-solidi (agarizzati) e liquidi (brodi nutritivi).

Sulla base della qualità della informazione che forniscono:

- Terreni **NON SELETTIVI**: consentono la crescita batterica di gran parte delle specie note.
- Terreni **SELETTIVI**: consentono la crescita di una (alcune) specie batteriche, inibendo la crescita delle rimanenti.
- Terreni **ELETTIVI**: favoriscono la crescita di una o alcune specie batteriche, sebbene non inibiscano la crescita di altre.
- Terreni **DIFFERENZIALI**: consentono di differenziare le specie batteriche sulla base delle loro caratteristiche biochimiche. Possono essere anche selettivi.

Il terreno agarizzato viene seminato (con il campione clinico) alla superficie, mentre quello liquido viene seminato al suo interno.

A seguito di incubazione a temperatura e tempo adeguati (37°C per almeno 16 h) la crescita batterica si osserva sottoforma di **COLONIE** (terreno agarizzato) oppure di **TORBIDITA'** (brodo)

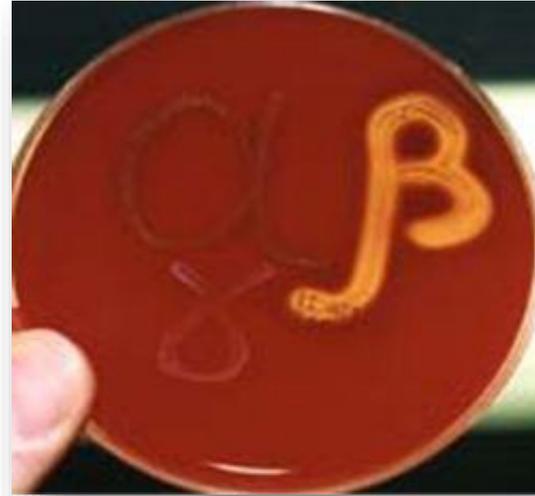
Esame colturale (isolamento)

Terreni NON SELETTIVI

Agar sangue montone



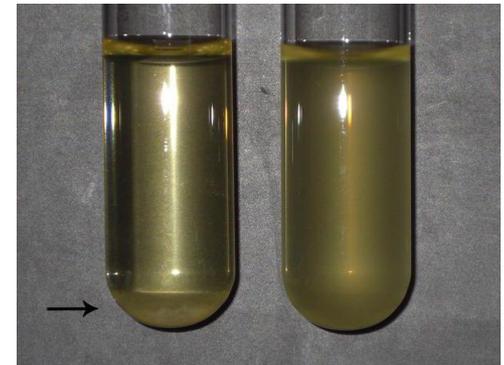
Agar sangue:
 α -, β -, γ -emolisi



Agar cioccolato



Brodo cuore-cervello



no crescita crescita

Esame colturale (isolamento)

Terreni SELETTIVI

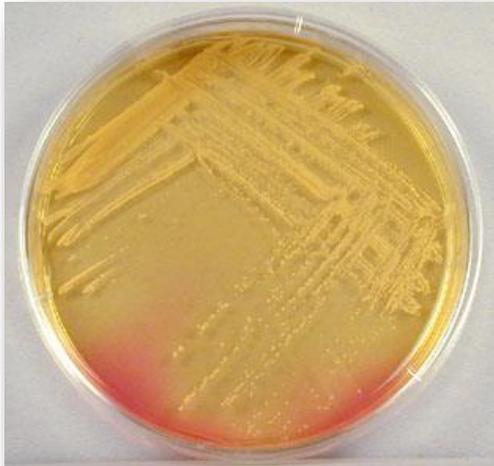
Thayer-Martin agar



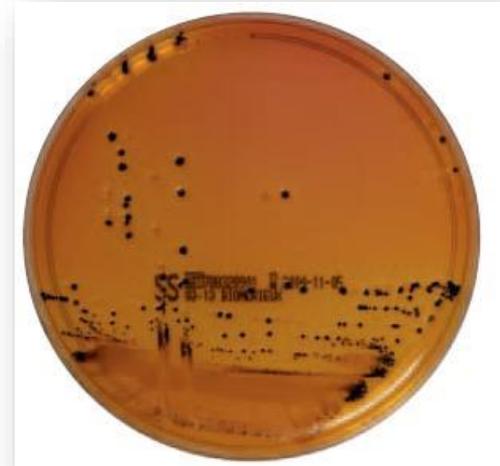
MacConkey agar



Mannitol Salt Agar



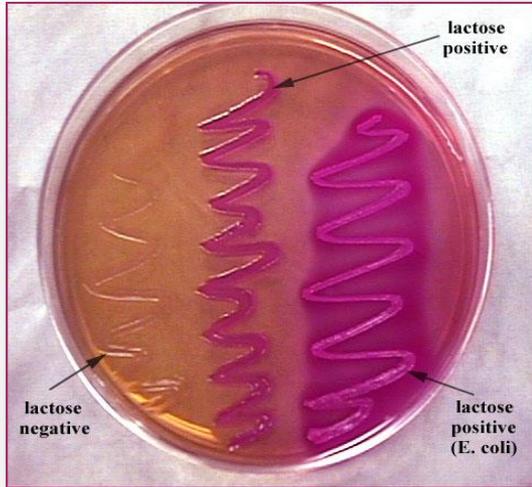
Salmonella-Shigella (SS) agar



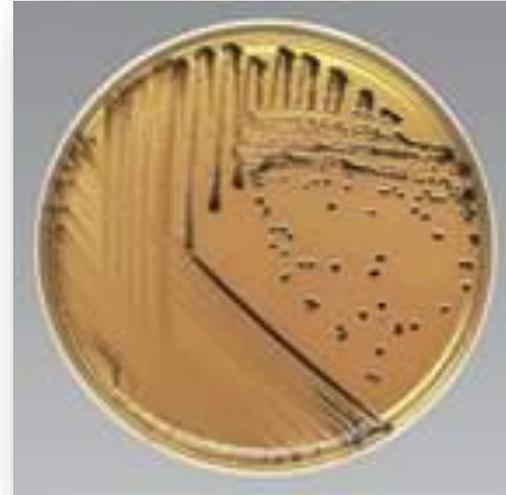
Esame colturale (isolamento)

Terreni DIFFERENZIALI

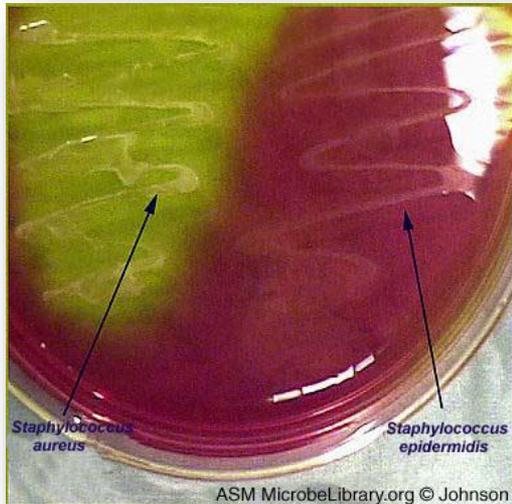
Agar MacConkey



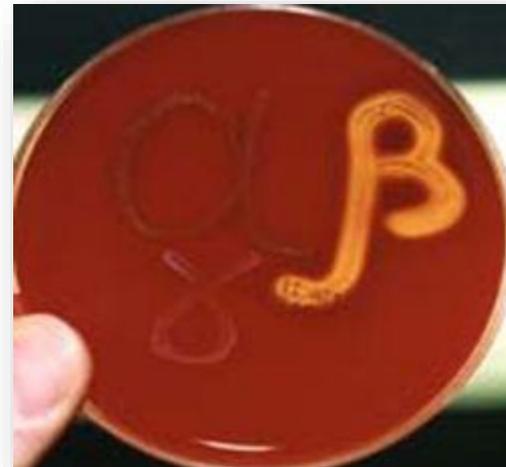
Agar SS



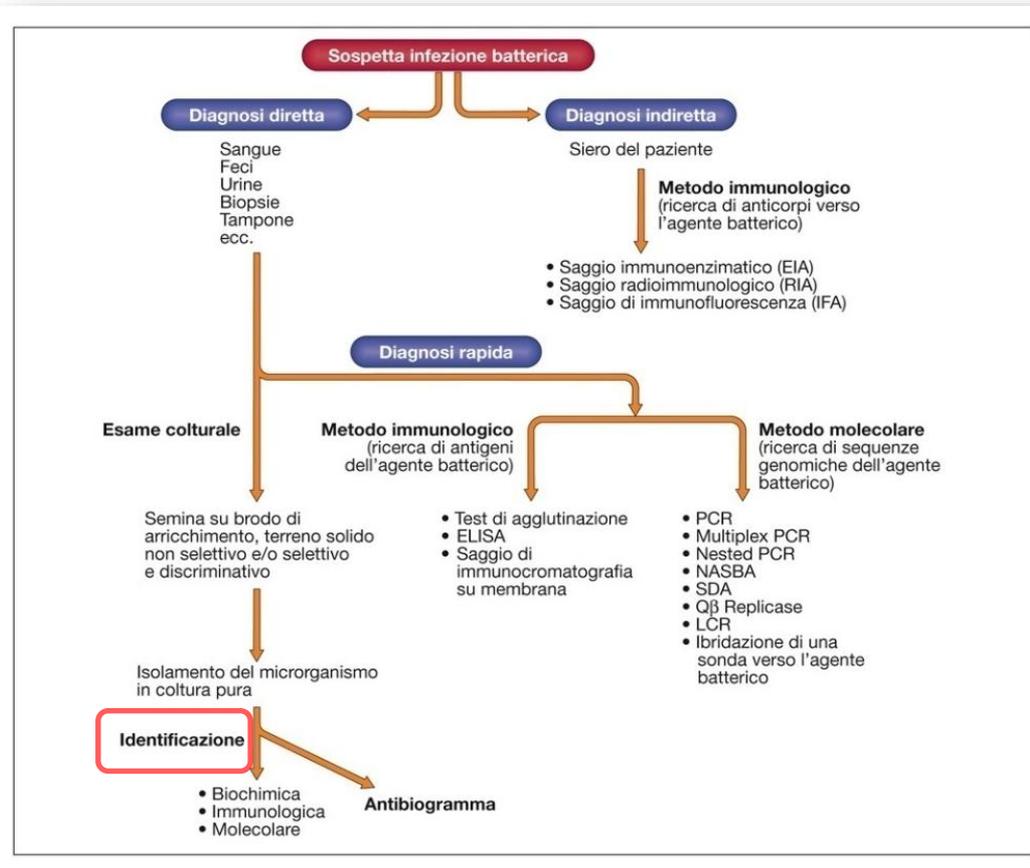
Agar sale-mannite



Agar sangue:
 α -, β -, γ -emolisi



Diagnosi DIRETTA



I risultati della ID presuntiva (microscopica) debbono essere confermati da **prove secondarie**, quali quelle fornite dai sistemi d'identificazione commerciali, al fine di ottenere una **ID DEFINITIVA o FINALE**.

I sistemi per la ID FINALE si basano su tests:

- biochimici (combinati): mediante definizione del **corredo enzimatico** del microrganismo in esame.
- sierologici: mediante **ricerca di antigeni specie-specifici** utilizzando anticorpi complementari.
- molecolari: ricerca di sequenze nucleotidiche (DNA o RNA) specie-specifiche

Identificazione “finale”

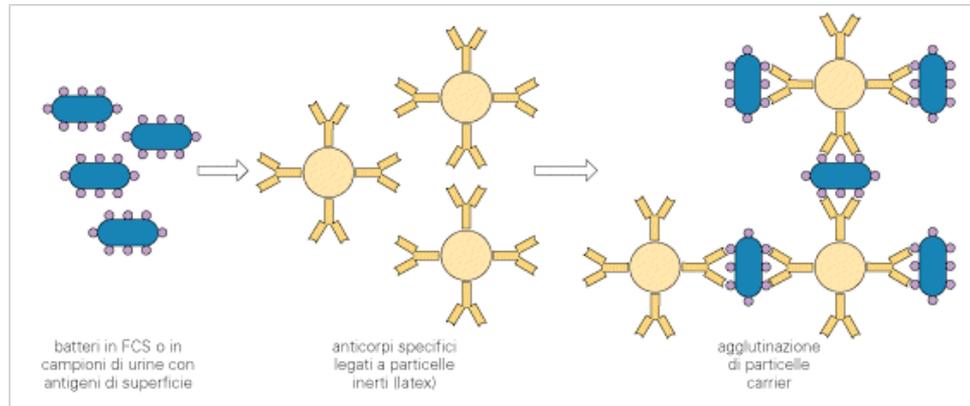
Identificazione sierologica

Ha come obiettivo finale la **ricerca di ANTIGENI specie-specifici**, direttamente nel campione biologico esaminato o da coltura pura (previo isolamento), mediante l'impiego di anticorpi complementari.

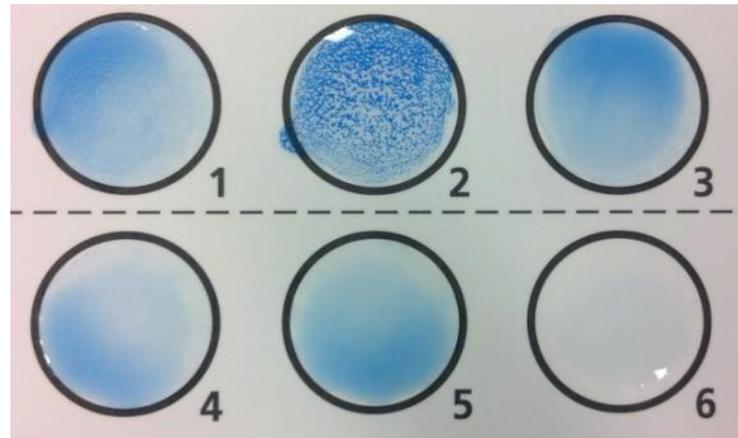
Principali tecniche per l'identificazione sierologica:

- reazione di agglutinazione
- reazione di immunofluorescenza
- saggio immunoenzimatico (ELISA)

Reazione di agglutinazione



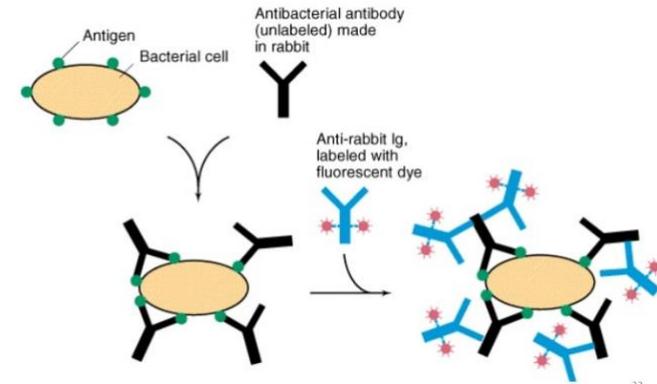
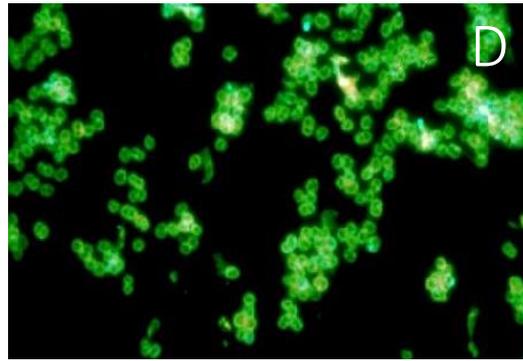
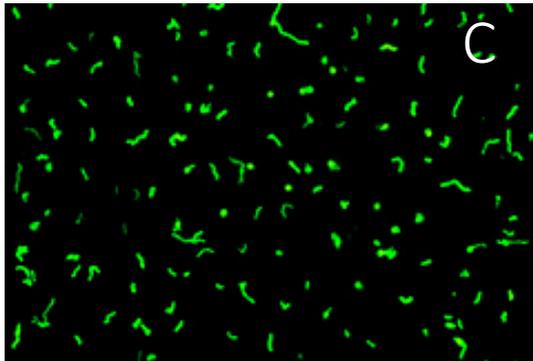
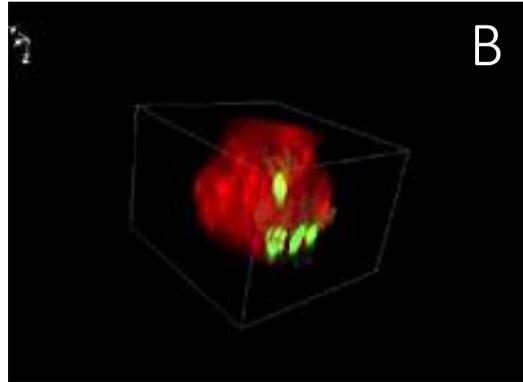
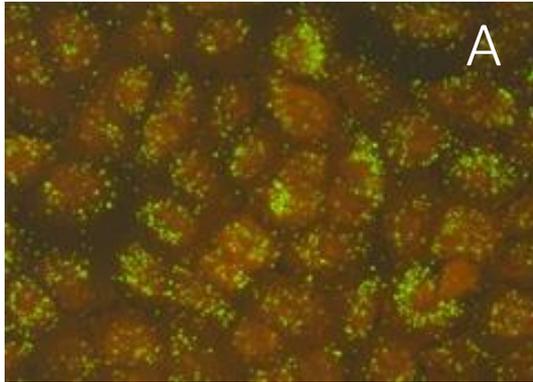
Ricerca di *Haemophilus influenzae* in un campione di liquor. Il campione viene cimentato con una sospensione di particelle di lattice ricoperte di Abs specifici, diretti contro antigeni capsulari di *H. influenzae*. L'interazione tra Ag e Ab causa un'immediata agglutinazione di particelle (epifenomeno) visibile ad occhio nudo.



2: positivo
1,3,4,5,6: negativi

Identificazione sierologica

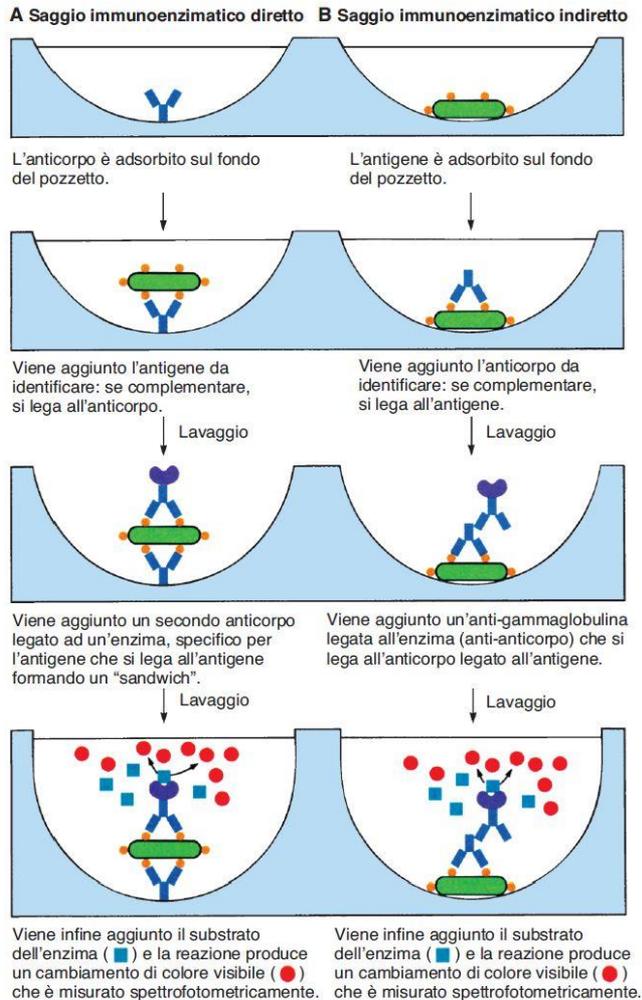
Reazione di immunofluorescenza



Ricerca di antigeni mediante immunofluorescenza: A) *Chlamydia trachomatis*; B) *Bordetella pertussis*; C) *Helicobacter pylori*; D) *Neisseria gonorrhoeae*.

ID FINALE - Identificazione sierologica

ELISA-test: diretto (sandwich) vs indiretto



La presenza di un Ag viene rivelata dall'utilizzo di un Ab legato ad un enzima in grado di catalizzare una reazione cromogena.

La tecnica ELISA può essere applicata per la ricerca di :

- antigeni (ELISA diretta)
- anticorpi (ELISA indiretta)



Identificazione “finale”

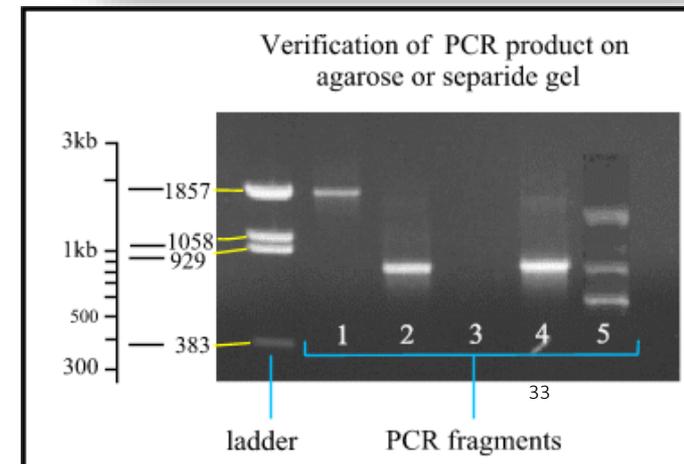
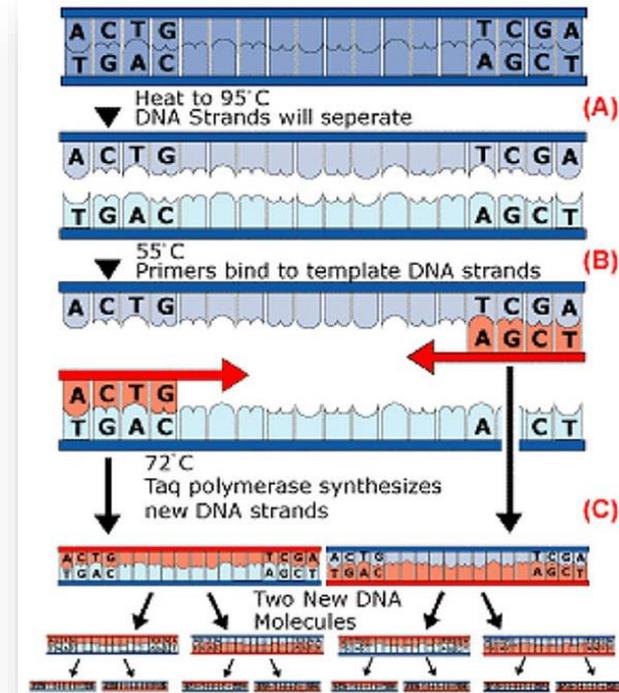
Identificazione molecolare

- Un metodo molto **specifico e sensibile** per la identificazione dell’agente patogeno si basa sulla **ricerca di caratteristiche (specie- o ceppo-specifiche) sequenze di DNA o RNA**, mediante:
 - amplificazione genica (Polymerase Chain Reaction, PCR): una sequenza genica viene amplificata (aumentata nel numero di copie) fino alla sua rivelazione
 - ibridazione con una “sonda” ossia una sequenza di acido nucleico a singolo filamento (RNA oppure DNA) complementare rispetto alla sequenza “target” che viene ricercata in uno specifico patogeno.
- Tali tecniche di biologia molecolare rappresentano strumenti diagnostici molto potenti, in quanto consentono:
 - la ricerca e la identificazione **rapida** di patogeni umani
 - la ricerca di microrganismi **a lenta crescita, difficilmente coltivabili**, oppure **non coltivabili**
 - la ricerca di determinanti genici codificanti per **la resistenza agli antibiotici**, sebbene non possano sostituirsi ai saggi di antibiotico-sensibilità
 - la **tipizzazione** dei microrganismi a fini epidemiologici

Identificazione molecolare

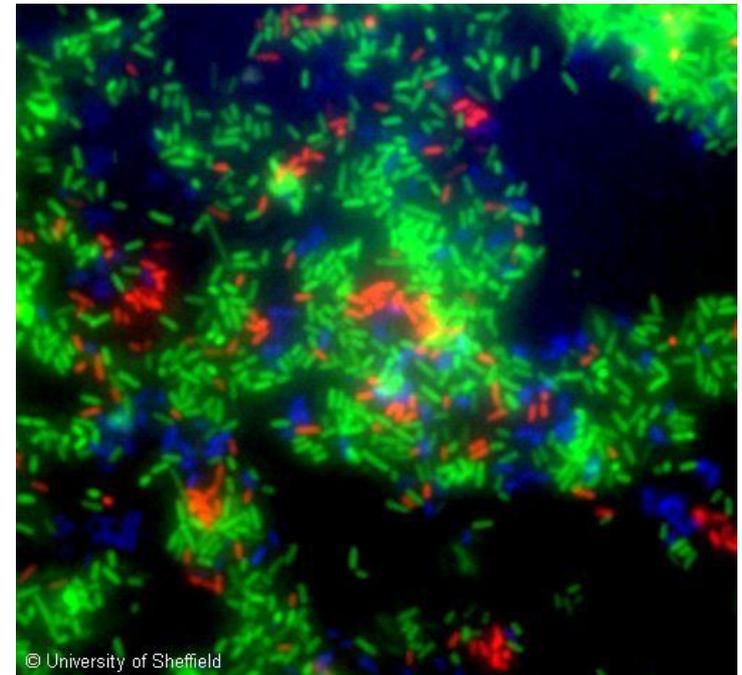
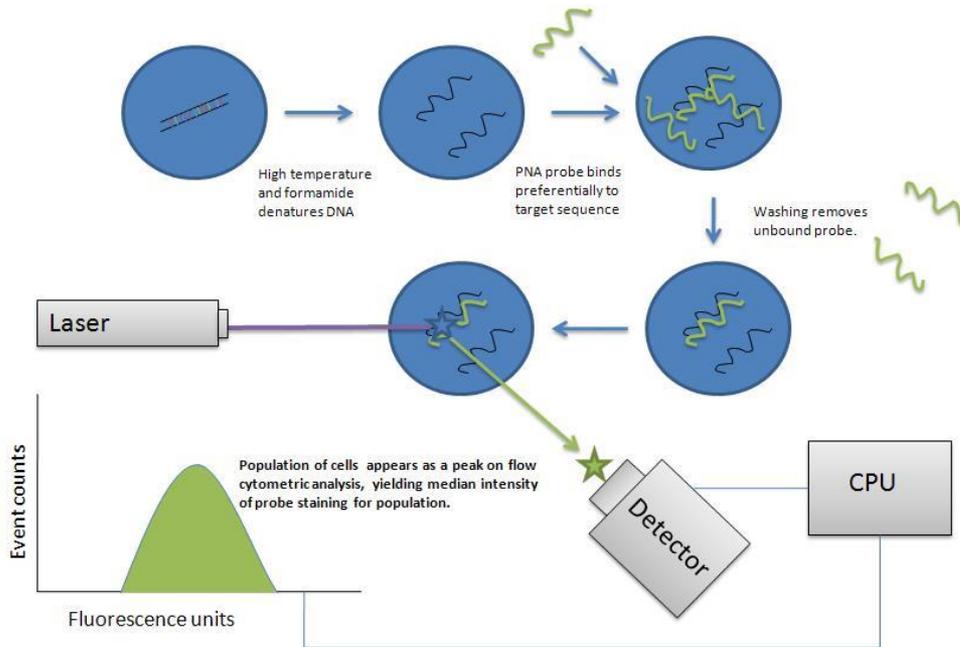
AMPLIFICAZIONE genica: Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Si basa sulla capacità della DNA-polimerasi di copiare un singolo filamento di DNA previo appaiamento dei primers, sequenze oligonucleotidiche fiancheggiando la sequenza “bersaglio”.
- Ciascun ciclo consiste delle seguenti fasi:
 1. denaturazione: separazione delle due eliche di DNA
 2. annealing: appaiamento dei primers all’elica complementare
 3. estensione: DNA-pol copia DNA bersaglio compreso tra primers
- Al termine di ciascun ciclo, il numero delle sequenze di DNA bersaglio è raddoppiato.
- 25-40 cicli sono sufficienti per ottenere una quantità di DNA bersaglio evidenziabile mediante migrazione elettroforetica.

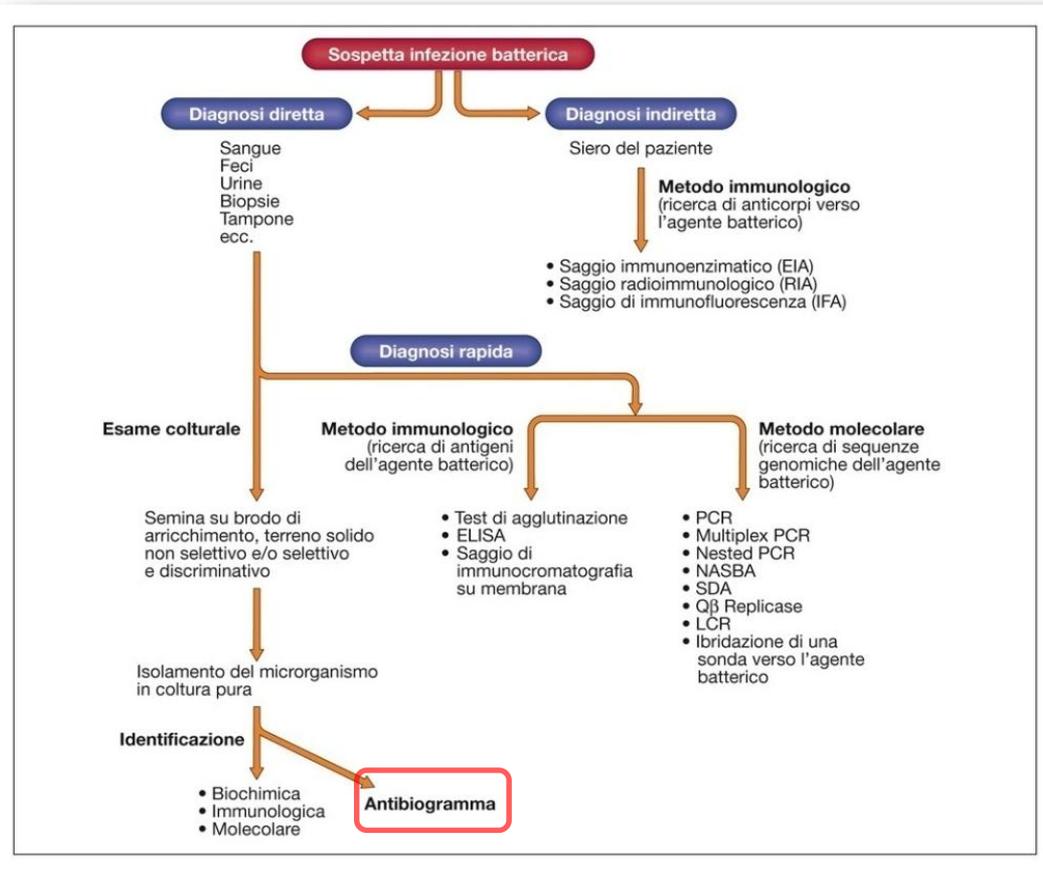


Identificazione molecolare

Tecniche di ibridazione *in situ*



Diagnosi DIRETTA



Antibiogramma

Obiettivi

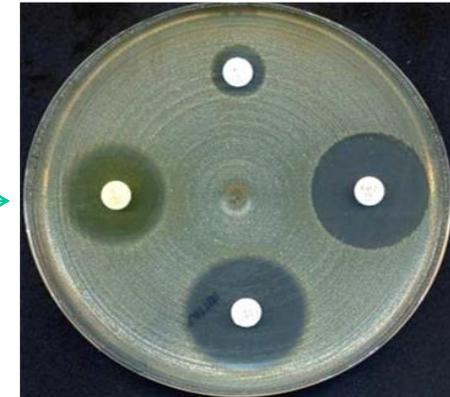
Una volta isolato il ceppo batterico è possibile procedere all'**antibiogramma**, ossia alla valutazione della sua sensibilità/resistenza agli antibiotici.

I tests di sensibilità agli antibiotici vengono eseguiti *in vitro*, ossia in **condizioni standardizzate per garantire la riproducibilità e la accuratezza dei risultati**.

L'obiettivo principale dell'antibiogramma è quello di predire il successo od il fallimento in vivo della terapia antibiotica.

Tra le tecniche utilizzate per l'esecuzione dell'antibiogramma, una delle più frequentemente utilizzate è il test di diffusione su agar (Kirby-Bauer).

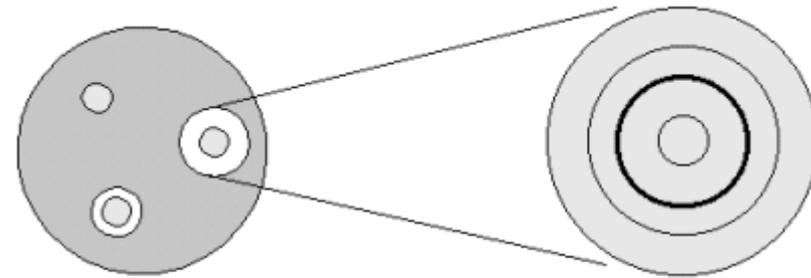
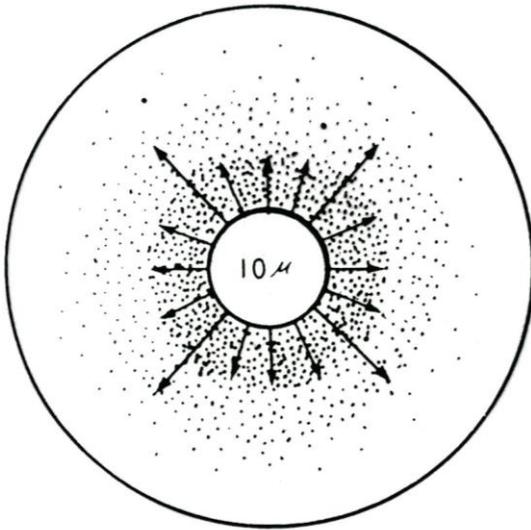
Kirby-Bauer Esecuzione



1. Allestimento di una sospensione batterica pura (ossia formata da un solo ceppo microbico)
2. Semina della sospensione alla superficie di un terreno agarizzato
3. Apposizione di dischetti antibiotizzati alla superficie dell'agar
4. Incubazione (37°C, 18-24h)
5. Lettura (misurazione degli aloni di inibizione) ed interpretazione (S, I, R) dei risultati

Kirby-Bauer

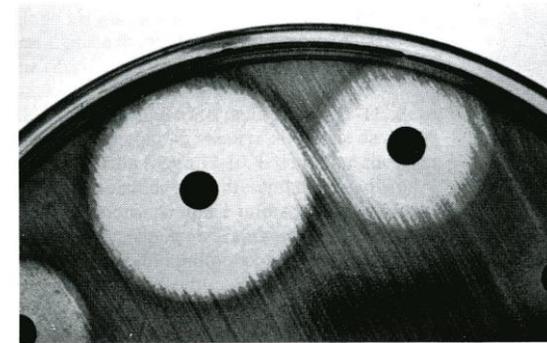
Principio



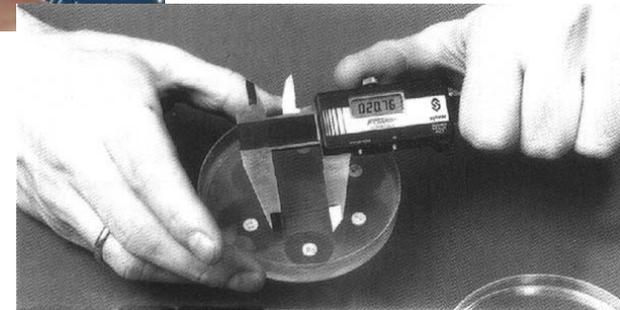
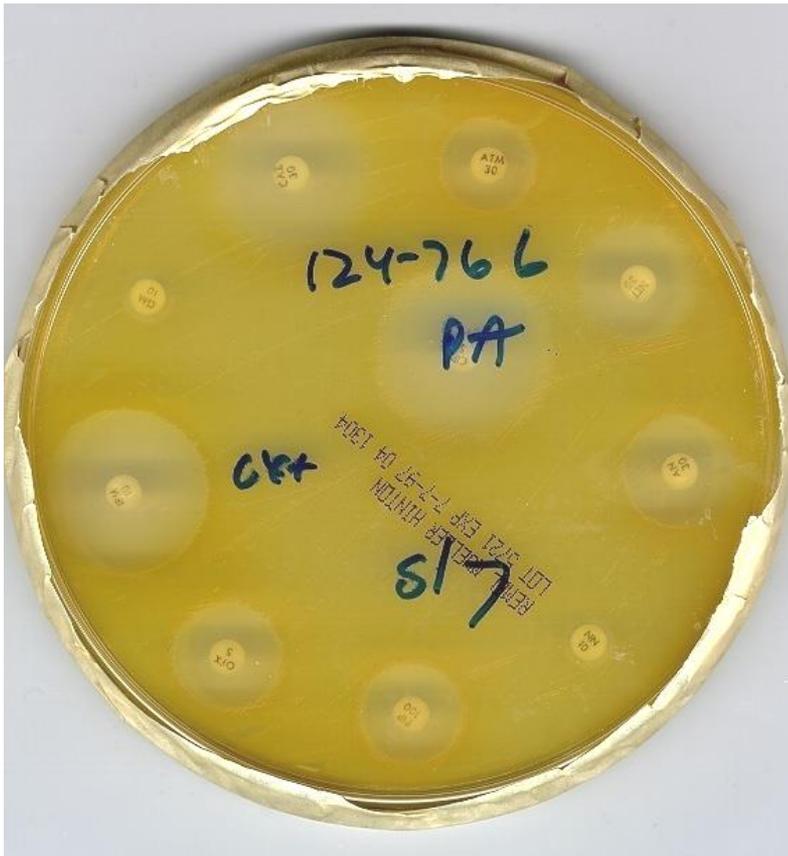
Kirby-Bauer Plate

Radial Diffusion Zones

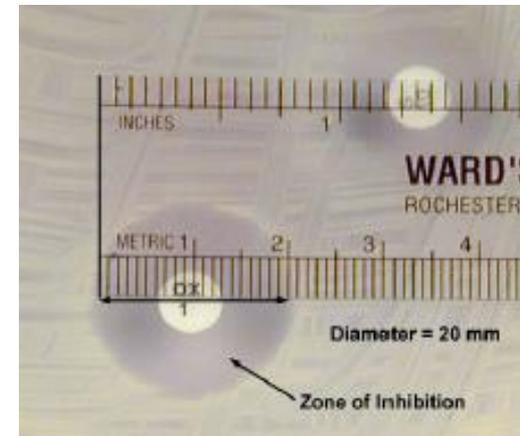
- A seguito della applicazione del dischetto, la molecola antibiotica diffonde nell'agar in direzione centrifuga, creando un gradiente dinamico di concentrazioni antibiotiche. Il microrganismo inizia a dividersi e cresce verso una massa critica.
- Si formerà un alone di inibizione dovuto alla inibizione della crescita batterica indotta dall'antibiotico fino a che ("testa" dell'alone) la densità cellulare sarà tale da assorbire la molecola nelle immediate vicinanze, in tal modo mantenendone le concentrazioni a livelli sub-inibenti e, quindi, permissivi per la crescita batterica.



Kirby-Bauer Lettura dei risultati



- La lettura del risultato consiste nella misurazione del diametro dell'alone di inibizione formatosi attorno al dischetto.
- Considerando il gradiente di concentrazione formatosi (tende a diminuire in direzione centrifuga), la sensibilità del ceppo batterico alla molecola saggiata sarà diretta funzione del diametro misurato: $S = k \cdot d$



Categorie terapeutiche: definizioni

Il valore del diametro dell'alone di inibizione verrà confrontato con dei **valori standards (breakpoints)** al fine di classificare il ceppo batterico in **UNA** di queste tre classi:

SENSIBILE

Il ceppo **viene inibito nella crescita od ucciso** da concentrazioni di antibiotico raggiungibili al sito di infezione*. L'antibiotico è indicato per la terapia. Indica una elevata probabilità di successo terapeutico.

INTERMEDIO (a sensibilità intermedia)

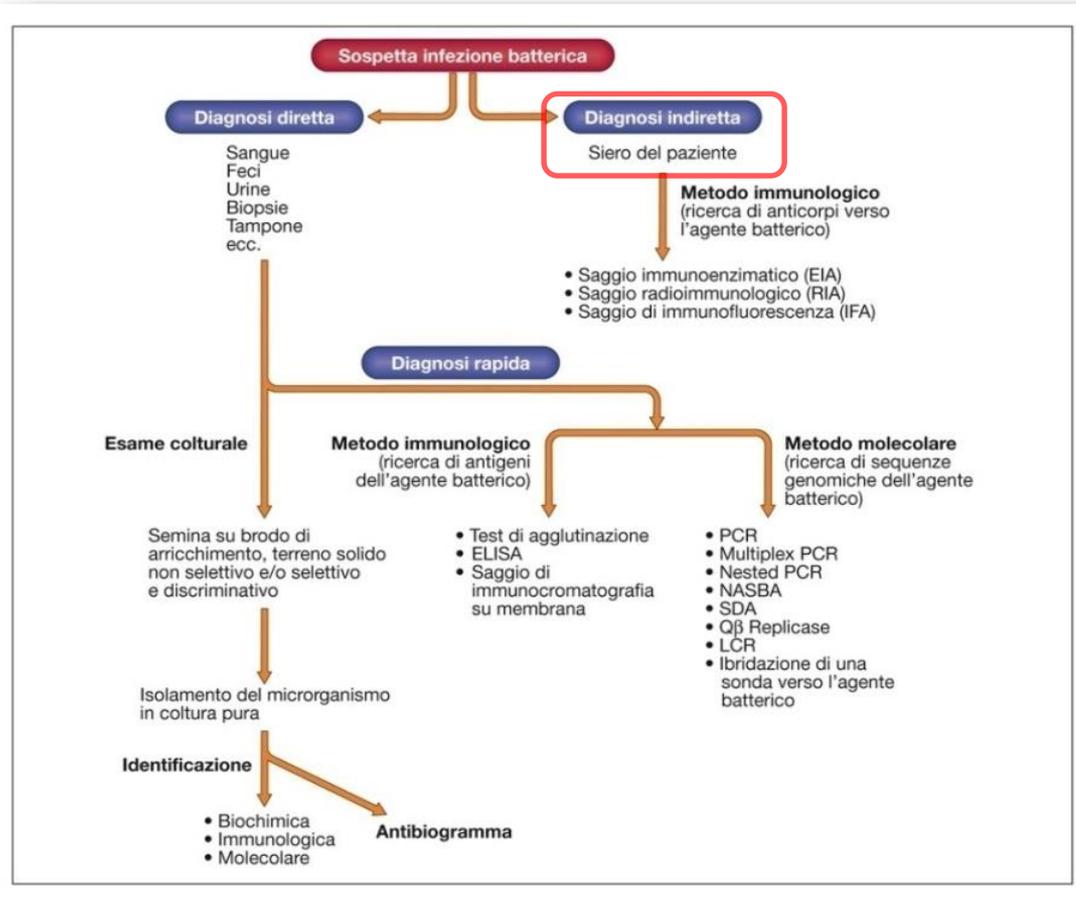
La efficacia dell'antibiotico non è ben definita. Potrebbe variare al sito di infezione. Si preferisce non utilizzare l'antibiotico in terapia. Indica un effetto terapeutico incerto.

RESISTENTE

Il ceppo **non viene ucciso** alle concentrazioni raggiunte al sito di infezione dall'antibiotico*. Questa categoria predice una elevata probabilità di fallimento terapeutico.

* a seguito di somministrazione di una dose terapeutica «usuale» di antibiotico

Diagnosi INDIRETTA



Diagnosi INDIRETTA

- La diagnosi INDIRETTA di una infezione microbica mira a rivelare una **risposta immunitaria umorale specifica dell'ospite all'agente eziologico**.
- **E' più tardiva di quella DIRETTA**, in quanto si può ricorrere ad essa soltanto quando si sia sviluppata la reattività immunitaria dell'ospite (a distanza di circa 10 gg dall'avvenuta infezione).
- Non è sempre possibile porre diagnosi indiretta (es. in pazienti con scarsa risposta immune).
- Pertanto, le indagini sierologiche diventano di ausilio diagnostico soltanto **quando sia impossibile ricercare l'agente eziologico con le tecniche dirette** (es. isolamento colturale difficoltoso o non possibile).
- L'accertamento indiretto, non comportando l'isolamento del germe, **preclude la possibilità di saggiare la antibiotico-sensibilità** dell'agente etiologico.

Diagnosi sierologica

Cinetica della risposta anticorpale

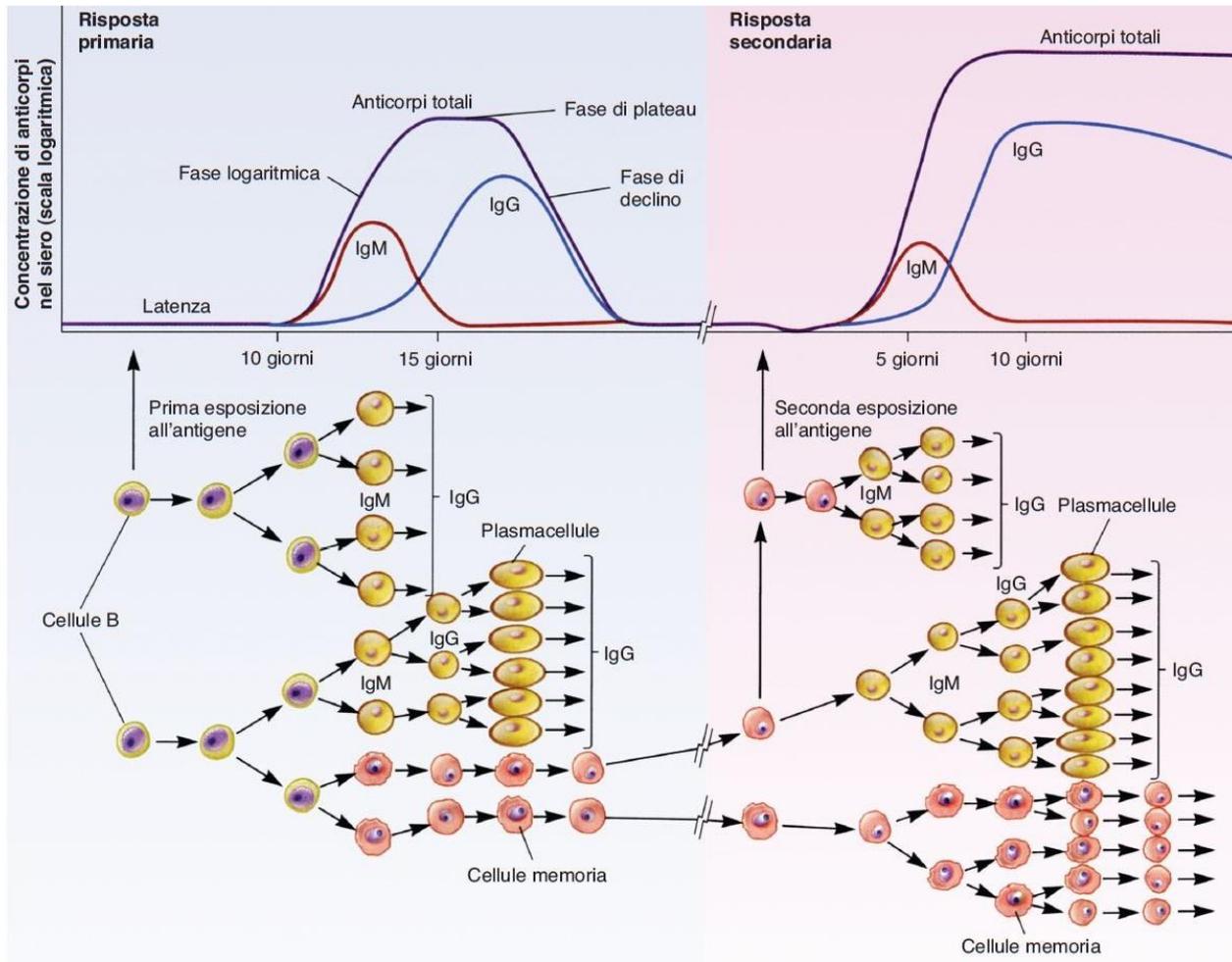


FIGURA 2-17. Cinetica di produzione degli anticorpi. Le quattro fasi della risposta anticorpale primaria correlano con l'espansione clonale delle cellule B attivate, il differenziamento in plasmacellule e la secrezione degli anticorpi. La risposta secondaria, è molto più rapida e la produzione totale di anticorpi è circa 1000 volte maggiore di quella della risposta primaria. (Riproduzione autorizzata da Willey J, Sherwood L, Woolverton C. (eds). *Prescott's Principles of Microbiology*. New York: McGraw-Hill; 2008).

IgM: normalmente transitorie ed indicative di una **infezione primaria e recente**.

IgG: compaiono più tardivamente, raggiungendo un picco dopo 3-6 settimane dall'infezione. Per questo è buona norma ricercarle in campioni successivi (primo: entro 5-10 giorni dall'infezione; secondo: 3-4 settimane dopo). Spesso persistono per tempi prolungati. Indicative di **infezione pregressa od attiva** (se titolo anticorpale è aumentato di almeno 4 volte nei due campioni successivi).

Diagnosi sierologica

La sierologia è utile per valutare il **timing** (recente o pregressa) ed il **decorso dell'infezione** (primaria vs reinfezione, acuta vs cronica).

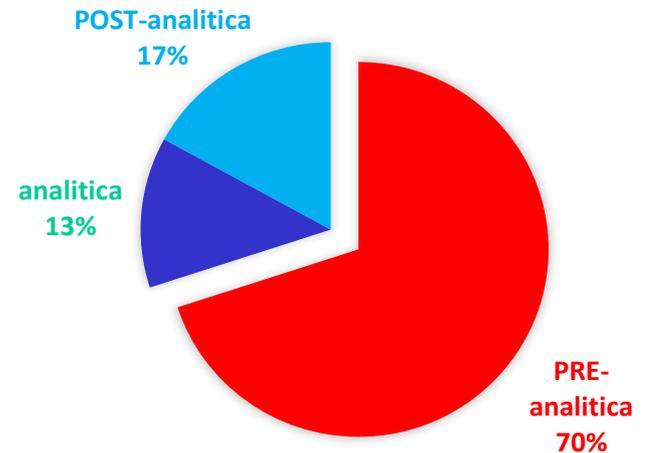
SIEROCONVERSIONE: inizia quando si ha la produzione di anticorpi a seguito di infezione **primaria**. Consiste nella comparsa di anticorpi specifici (IgM o IgG) a seguito di un test precedente negativo.

- Presenza di IgM specifiche, nelle infezioni acute o nella fase acuta di infezioni persistenti.
- Aumento di IgG in assenza o lieve aumento di IgM, nelle reinfezioni (risposta anamnestic).
- Presenza di IgA sieriche specifiche, nelle infezioni subacute o croniche.

La sieroconversione e la reinfezione sono indicate da un aumento del titolo anticorpale di almeno 4 volte tra fase acuta (entro 7-10 gg da esposizione/sintomatologia) e convalescenza (dopo 2-3 settimane).

Distribuzione degli errori nella Medicina di Laboratorio

- Fase pre-analitica : 70%
 - Fase analitica : 13%
 - Fase post-analitica : 17%
- (Plebani et al. 2001)



- **La maggior parte degli errori** nella medicina di laboratorio avviene **durante la fase PRE-analitica**.
- Un errore nell'iter diagnostico si tradurrebbe in un **maggiore costo sociale** (ridotta qualità servizio sanitario, mortalità) e **finanziario** (aumentata spesa sanitaria per aumentata ospedalizzazione, errata terapia, etc.).
- E' pertanto necessaria una continua formazione/aggiornamento sulle tecniche di prelievo, trasporto dei campioni biologici.

Qualità della indagine diagnostica microbiologica

- Per una diagnosi accurata ed attendibile **la richiesta deve essere congrua rispetto al quesito diagnostico** ed il **campione biologico deve essere appropriato rispetto alla richiesta di esami**.



- Solo la stretta collaborazione tra tutte le figure (Microbiologo, Clinico, Parasanitari)** coinvolte a diverso titolo nell'indagine microbiologica (che ha inizio al letto del malato, per terminare con la visione del referto) ed il rispetto in tutte le fasi delle corrette procedure può garantire la piena valorizzazione di una indagine microbiologica.