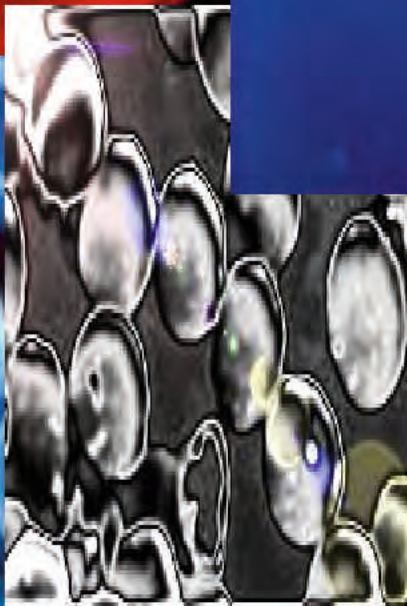
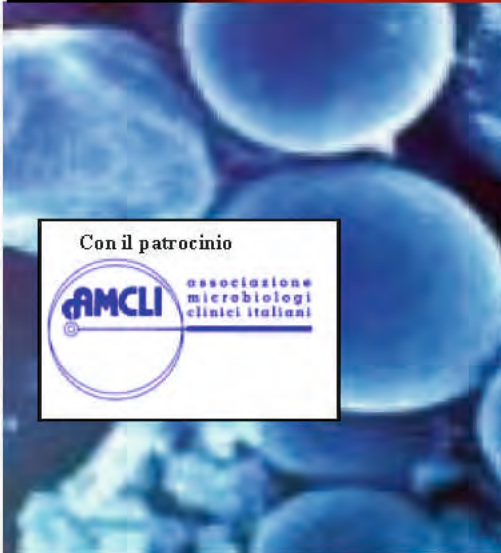
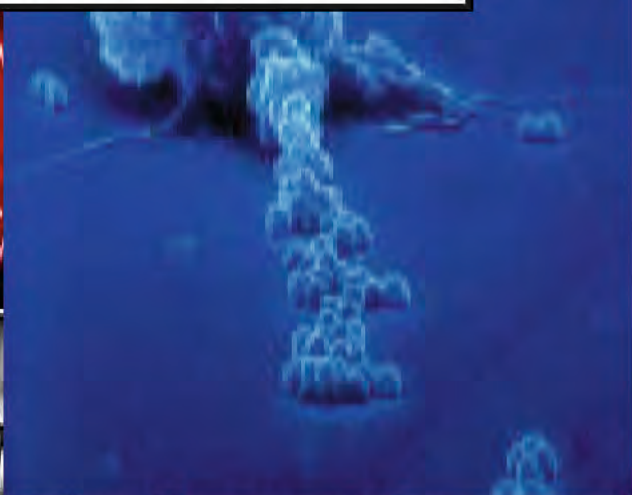




**RACCOMANDAZIONI PER**  
**L' ESECUZIONE DELLE INDAGINI**  
**MICROBIOLOGICHE DI CAMPIONI**  
**DELLE VIE RESPIRATORIE DI**  
**PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA**

*a cura del*  
*Gruppo Professionale Microbiologi della*  
*Società Italiana Fibrosi Cistica*  
Marzo 2010



Con il patrocinio



associazione  
microbiologi  
clinici italiani



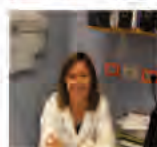
SOCIETÀ  
ITALIANA  
PER LO STUDIO  
DELLA  
FIBROSI CISTICA



## AUTORI



Silvia Campana  
Centro Regionale Fibrosi Cistica  
Azienda Ospedaliero Universitaria Meyer  
V.le Pieraccini 24, 50139 Firenze



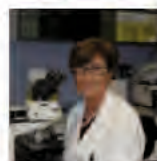
Lisa Cariani  
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico  
Laboratorio di Microbiologia della Fibrosi Cistica  
Via San Barnaba 8 – 20122 Milano



Flavio Favari  
Servizio di Microbiologia Immunologia e Virologia  
Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona  
Piazzale Stefani 1 - 37126 Verona



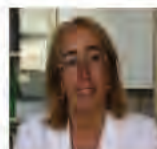
Ersilia Fiscarelli  
Dipartimento dei Laboratori, Microbiologia della Fibrosi Cistica  
Ospedale Pediatrico Bambin Gesù  
Piazza S. Onofrio 4 – 00165 Roma



Maria Laura Garlaschi  
Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico  
Laboratorio di Microbiologia della Fibrosi Cistica  
Via San Barnaba 8 – 20122 Milano



Graziana Manno  
Dipartimento di Scienze Pediatriche Università di Genova  
e Laboratorio Generale di Analisi e Microbiologia  
Istituto G. Gaslini, Largo G. Gaslini 5 – 16147 Genova



Esther Manso  
SOS Microbiologia  
Ospedali Riuniti di Ancona  
Via Conca 71 -60020 Ancona



### **Premessa del Presidente della Società Italiana di Fibrosi Cistica (SIFC)**

Le infezioni batteriche polmonari sono responsabili della maggior parte della morbilità e mortalità in pazienti con Fibrosi Cistica (FC). La microbiologia delle infezioni presenta aspetti peculiari rispetto a quella che caratterizza le infezioni in pazienti con altra patologia: i fenotipi dei batteri coinvolti sono frequentemente atipici e i batteri più comuni nella popolazione generale sono meno frequenti. L'uso prolungato di antibiotici nei pazienti FC porta inoltre allo sviluppo di germi multi resistenti e ciò rende necessario eseguire test di sensibilità e di sinergismo.

Si tratta quindi di una "microbiologia complicata", così come è stata definita dal documento europeo che ha stabilito gli standard di cura per la Fibrosi Cistica, e che, in quanto tale, necessita di conoscenze ad hoc e di esperienza specifica che può essere acquisita solo presso i Centri specializzati per la Fibrosi Cistica.

I grossi problemi che i clinici e i microbiologi devono affrontare per dare risposte affidabili ai loro pazienti con FC sono poco conosciuti al di fuori dei laboratori dedicati alla FC. La microbiologia "complicata" richiede l'uso di terreni di coltura selettivi per patogeni poco comuni e una approfondita conoscenza specialistica, tanto da far ritenere che l'isolamento di uno di questi germi nell'ambito di laboratori di microbiologia standard richieda la conferma di tale isolamento in un laboratorio dedicato alla FC.

La produzione di queste linee guida da parte del Gruppo Professionale dei Microbiologi della SIFC è quindi quanto mai opportuna: sono descritte in dettaglio e nella loro complessità, ma con taglio molto pratico, tutte le procedure che devono essere messe a punto e seguite per poter fornire al paziente un referto microbiologico che abbia effettivo significato clinico. La SIFC è quindi molto grata a tutti i microbiologi che hanno contribuito alla loro stesura. E' proprio l'adozione di queste procedure a conferire le caratteristiche di alta specializzazione ed eccellenza ai laboratori dedicati alla FC, dei quali dovrebbero essere forniti tutti i Centri di Riferimento qualificati per questa malattia.

Carla Colombo  
Presidente SIFC



### **Il Gruppo Professionale di Microbiologia della Società Italiana di Fibrosi Cistica**

Il gruppo dei microbiologi che si occupano di fibrosi cistica (FC) è nato ufficialmente nel 1996 raggruppando i professionisti che si occupavano delle indagini microbiologiche relative ai pazienti FC all'interno dei vari Centri di cura Italiani. Scopo prioritario del gruppo all'epoca era stato di verificare le tecniche utilizzate nel processare i campioni respiratori dei pazienti FC al fine di uniformare tale metodiche secondo le indicazioni della letteratura internazionale. Da questo sforzo collaborativo è stato redatto un protocollo pratico: "Raccomandazioni per l'esecuzione delle indagini microbiologiche di campioni respiratori dei pazienti con fibrosi cistica" al quale i laboratori di microbiologia si sono uniformati secondo le proprie esigenze e possibilità. Negli anni successivi da parte dei microbiologi affiliati ai centri vi è stato un interesse crescente verso approcci di microbiologia diagnostica più sofisticati e specialistici. Questo notevole salto di qualità è stato possibile anche grazie alla collaborazione con strutture universitarie Italiane ed Internazionali. Il gruppo dei microbiologi si è quindi allargato arricchendosi di nuove realtà, per citare solo alcuni dei principali campi di studio: indagini epidemiologiche tramite tipizzazione dei ceppi batterici a livello molecolare, identificazioni di ceppi batterici "difficili" tramite indagini molecolari, studi sulla sinergia delle associazioni di antibiotici. Tali tipi di indagini non sono accessibili a tutti i laboratori di microbiologia diagnostica, tuttavia esistono alcuni laboratori specialistici che eseguono questo tipo di esami specifici per tutti i centri Italiani che ne facciano richiesta. L'attività del gruppo attualmente si rivolge ad una ottimizzazione delle già qualificate risorse nazionali, mantenendo e incrementando le collaborazioni internazionali, promuovendo la formazione attraverso l'organizzazione di corsi teorico-pratici, e suddividendo le indagini microbiologiche più specifiche fra i laboratori Italiani più attrezzati da considerare un utile riferimento per tutti gli altri centri Italiani. Questa versione aggiornata delle raccomandazioni da utilizzare nelle analisi microbiologiche relative ai pazienti con fibrosi cistica vuole prioritariamente sottolineare gli accorgimenti e approcci metodologici da ritenersi indispensabile per la corretta esecuzione di specifiche indagini microbiologiche. In seconda istanza si vuole fornire una revisione ed un aggiornamento delle indagini specialistiche che sono necessarie per il corretto monitoraggio delle infezioni di cui soffrono i pazienti con fibrosi cistica.

E' auspicio dei microbiologi che hanno redatto questo documento che esso possa rappresentare un utile strumento di consultazione anche per chi raramente od occasionalmente si trova ad affrontare la diagnostica di campioni di pazienti FC o con patologie polmonari croniche.

### **Introduzione**

La Fibrosi cistica è la principale malattia genetica della razza caucasica caratterizzata da trasmissione autosomica recessiva. Il difetto genetico alla base di questa importante patologia causa alterazioni delle funzioni di trasporto ionico a livello degli epitelii a cui conseguono anomalie delle secrezioni esocrine. In Italia, sulla base di dati derivati dallo screening neonatale, l'incidenza di fibrosi cistica è stimata intorno a 1:3000 nati vivi, con la nascita di circa 200 nuovi pazienti all'anno.

La storia naturale della fibrosi cistica (FC) è condizionata principalmente dal grado di interessamento del polmone, che si manifesta con un progressivo decremento della funzionalità respiratoria. Le infezioni polmonari si presentano con modalità ricorrente e cronica e persistono per tutta la durata della vita dei pazienti, generando quello stato di flogosi permanente che sta alla base del danno polmonare. Il polmone di pazienti con FC rappresenta un ambiente favorevole alla colonizzazione da parte di batteri patogeni opportunisti. Negli individui sani i batteri inalati vengono rimossi dalla clearance mucociliare e distrutti dal pH acido dello stomaco; i patogeni che eventualmente riescono a superare la clearance mucociliare sono poi eliminati da cellule



fagocitiche, aiutate da meccanismi immunologici di vario tipo, inclusi specifici anticorpi opsonizzanti, nei pazienti affetti da fibrosi cistica tali meccanismi difensivi non funzionano correttamente. La colonizzazione batterica delle vie aeree in FC è una combinazione di vari fattori, tra i quali gli effetti patofisiologici conseguenti al difetto del gene CFTR, che ostacola la clearance mucociliare, e l'abilità di un certo spettro di batteri opportunisti a superare le normali difese polmonari.

La suscettibilità dei pazienti con FC alle infezioni polmonari è nota fin dal 1940; prima dell'avvento della terapia antibiotica la maggior parte dei pazienti moriva prima di raggiungere i 5 anni di età, principalmente a causa di infezioni causate da *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). L'introduzione della penicillina, unitamente ad un programma terapeutico di vasta portata e ad un *follow-up* dei pazienti, effettuato in centri specializzati, ha migliorato in modo drastico la prognosi della malattia e la mortalità è passata dal 61% del 1944 al 18% del 1948. Tutto questo ha consentito di prolungare le aspettative di vita e la media di sopravvivenza arriva oggi a circa 30 anni. I dati prospettici indicano, inoltre, uno spostamento della media di sopravvivenza intorno ai 40 anni, il che implica un aumento del numero di pazienti adulti affetti da questa patologia, che attualmente costituiscono circa la metà degli assistiti. Le esacerbazioni che si verificano a carico del tratto respiratorio sono causate principalmente da batteri (63%), da batteri e virus (13%) e da virus (6%).

Lo spettro dei microrganismi che si isolano dai pazienti con fibrosi cistica è limitato e solo per alcuni di essi è stata dimostrata una inequivocabile rilevanza clinica (1):

Microrganismo	Prevalenza	Ruolo nella malattia polmonare di pazienti FC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59	Provato
<i>Staphylococcus aureus</i>	48	Provato
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	3	Provato
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	NON Provato
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9	Provato
<i>Burkholderia gladioli</i>	<1	Improbabile
<i>Ralstonia spp</i>	<1	Improbabile
<i>Pandoraeae spp</i>	<1	Possibile
<i>Mycobacterium spp</i>	13	Provato
<i>Haemophilus influenzae</i>	15	Probabile
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	Sconosciuta
<i>Aspergillus fumigatus</i>	21-46%	Potenziale
<i>Aspergillus flavus</i>	2-6,%	Potenziale
<i>Scedosporium apiospermum</i>	3-8%	Potenziale
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1-6%	Potenziale
RSV	Sconosciuta	Provato
Influenza virus	Sconosciuta	Provato
Anaerobi	Sconosciuta	Potenziale

- Adattato da Gilligan *et al* 2006 (1)



### Infezioni batteriche

Le infezioni polmonari causate da batteri sono particolarmente rilevanti nei pazienti affetti da FC per due principali motivi: rappresentano il fattore di innesco e di mantenimento delle lesioni polmonari e sono la principale causa di morbilità e mortalità in FC. La microbiologia delle infezioni polmonari batteriche in FC ha molti aspetti singolari:

- una localizzazione per lo più esclusiva e cronica del germe a livello delle vie aeree, con episodi di esacerbazione che si sovrappongono al quadro di base;
- i pazienti con FC non hanno alcuna deficienza immunitaria e, seppur colonizzati da germi fin dai primi mesi di vita, raramente manifestano episodi di batteremia clinicamente rilevanti. Eccetto che per il tratto respiratorio, i pazienti FC non sono più suscettibili degli individui sani alle infezioni;
- le infezioni respiratorie sono causate da un limitato numero di germi opportunisti, di solito *S. aureus*, nei primi anni di vita, e da batteri Gram-negativi non fermentanti, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) negli anni successivi: infatti con il progredire dell'età del paziente la flora patogena tende a modificarsi;
- una volta avvenuta la colonizzazione da parte di un batterio, si assiste alla sua diffusione a livello di tutto l'apparato respiratorio. Il sistema immunitario dell'ospite è però inefficiente a risolvere l'infezione e nel suo complesso la risposta immune è oggi giudicata più dannosa che utile a causa dei danni provocati dagli immunocomplessi e di uno squilibrio a favore delle citochine pro-infiammatorie, come interleuchina-8 (IL-8) e tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ );
- i germi, a seguito della terapia antibiotica utilizzata, sviluppano progressivamente meccanismi di resistenza che rendono problematico il trattamento delle infezioni;
- esistono ceppi batterici altamente trasmissibili responsabili di infezioni crociate tra pazienti.

I germi patogeni più comunemente responsabili delle infezioni polmonari in pazienti con FC sono batteri appartenenti alle specie *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) e altri batteri non fermentanti il glucosio come *Achromobacter xylosoxidans* (*A. xylosoxidans*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) e microrganismi appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (*B. cepacia* complex).

I pazienti con FC vanno incontro a infezioni respiratorie fin dai primi mesi di vita; nei bambini i batteri più frequentemente riscontrati sono *S. aureus* e *H. influenzae*, ma possono essere presenti anche microrganismi come *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) e *Enterobacteriaceae*.

*S. aureus* è un germe che si ritrova a livello delle cavità nasali del 10% della popolazione sana; la sua facilità a colonizzare la vie aeree dei pazienti fibrocistici è legata all'alto contenuto di NaCl delle secrezioni bronchiali. Poiché è stato osservato che i primi batteri che colonizzano il polmone FC sono *S. aureus* e *H. influenzae*, seguiti successivamente da *P. aeruginosa*, è stato ipotizzato che i primi possano esacerbare l'infiammazione, così da facilitare la seguente colonizzazione delle vie aeree da parte di *P. aeruginosa*.

*B. cepacia* complex è un patogeno di relativamente recente segnalazione per i pazienti con fibrosi cistica. È un gruppo complesso di microrganismi costituito, nella classificazione tassonomica recente, da circa 15 sottospecie diverse. L'identificazione delle sottospecie o genomovar è alla portata solo di laboratori specialistici tuttavia può rivestire notevole importanza in quanto alcuni genomovar hanno una particolare rilevanza clinica. In particolare il genomovar II e III (chiamate rispettivamente *B. multivorans* e *B. cenocepacia*) possono causare un quadro clinico di particolare gravità: "*B. cepacia* sindrome", caratterizzato da polmonite fulminante e sepsi(2).

Queste sottospecie sono caratterizzate, oltre che da un'alta virulenza, anche da elevata trasmissibilità. Sono stati documentati molti episodi epidemici come quelle causate da un clone di *B. cenocepacia* detto ET12. Tali episodi epidemici sono stati documentati anche in Italia ed hanno portato ad una rigida implementazione delle norme di segregazione all'interno dei centri di cura.



L'infezione con alcuni genomovar del *B. cepacia* complex può inoltre essere considerata una controindicazione al trapianto polmonare.

In alcuni casi gli anaerobi possono rivestire un ruolo patogeno nei pazienti FC, devono essere ricercati qualora vi sia una specifica richiesta del clinico e soltanto su campioni idonei per tale tipo di indagini.

Dall'insieme di queste considerazioni nasce la necessità che il microbiologo ponga un'attenzione particolare a questo complesso gruppo di microrganismi ed interagisca in prima persona con i laboratori di riferimento.

### **Infezioni virali**

I virus respiratori (virus dell'influenza A e B, virus parainfluenzale 1 e 3, *Rhinovirus*, *Adenovirus* e virus respiratorio sinciziale) sono responsabili di esacerbazioni della patologia polmonare dei pazienti con FC. La funzionalità polmonare di questi pazienti può diminuire del 30% durante le infezioni respiratorie virali. Nell'età pediatrica, a seguito dell'infezione da virus respiratorio sinciziale, si riscontra una maggiore suscettibilità all'infezione batterica da *P. aeruginosa*.

Le infezioni virali si comporterebbero quindi come eventi scatenanti. Alcuni studi hanno poi dimostrato che il virus dell'influenza di tipo A può essere associato a grave deterioramento polmonare in pazienti FC e che nei pazienti in fase avanzata di malattia può determinare la morte. Questi dati enfatizzano l'importanza della vaccinazione antiinfluenzale.

### **Infezioni da miceti**

I miceti colonizzano il tratto respiratorio in una percentuale che va dal 9 al 57% dei pazienti affetti da FC, e tale colonizzazione è facilitata dai frequenti e prolungati cicli di terapia antibiotica a cui i pazienti sono sottoposti, all'uso di corticosteroidi e dall'aumento dell'età media dei pazienti.

Inoltre, con il miglioramento delle tecniche di laboratorio per il loro isolamento e l'identificazione, la prevalenza delle diverse specie di miceti ritrovati dalle colture espettorato è in aumento negli ultimi anni.

Il ruolo dei miceti, in particolare di *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) nella patologia polmonare è ancora da chiarire, anche se sembra che la colonizzazione cronica fungina agisca in sinergia con la colonizzazione batterica, causando un peggioramento della malattia polmonare. *A. fumigatus* è responsabile di diverse malattie nel contesto della FC: asma, bronchite, aspergilloma e aspergilloso bronco-polmonare allergica (ABPA). Rilevante è il ruolo patogeno dei funghi nei pazienti sottoposti a trapianto polmonare. In generale l'incidenza delle infezioni fungine nei pazienti trapiantati di polmone si aggira intorno al 5-10%. Per quanto riguarda le infezioni aspergillari nei pazienti trapiantati, queste sono per la maggior parte tracheobronchiti o infezioni dell'anastomosi bronchiale, seguite dalle infezioni polmonari invasive e infezioni invasive disseminate; queste ultime sono le complicanze infettive fungine più temibili nei trapiantati, con un esito frequentemente fatale (70%) (3).

*A. fumigatus* si ritrova frequentemente nelle colture delle secrezioni respiratorie dei pazienti con FC (16-56%). La colonizzazione delle vie aeree è infrequente nel bambino e generalmente è susseguente alle infezioni batteriche. Negli adulti con FC una percentuale che va dallo 0.9 all'11 % l'infezione da *A. fumigatus* si associa ad aspergilloso broncopolmonare allergica (ABPA), che può manifestarsi con una sintomatologia di tipo asmatico. Anche altre specie di *Aspergillus* sono riscontrabili nel contesto della FC: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans*, ma generalmente sono specie isolate in modo transitorio. Invece *Aspergillus terreus* è generalmente responsabile di forme di colonizzazione cronica con forme cliniche di ABPA e IA simili a quelle osservate per *A. fumigatus* (4).

Recentemente un ruolo importante è stato riconosciuto anche a *Scedosporium apiospermum* (*S. apiospermum*) che è il secondo fungo filamentoso più frequentemente isolato dalle colture espettorato. *S. apiospermum* è generalmente responsabile di una colonizzazione cronica dell'albero respiratorio, colonizzazione che raramente è associata a segni clinici. Questo fungo, riscontrabile



nel 3.3-10% dei pazienti con FC è spesso associato a *A. fumigatus* e contribuisce alla reazione infiammatoria e il progressivo deterioramento delle funzioni polmonari, è inoltre responsabile di forme allergiche simili all'ABPA. La presenza di *S.apiospermum* nelle colture è una controindicazione per il trapianto di polmone per la possibilità di complicanze quali micosi cerebrale o disseminata nei pazienti in fase di immunocompromissione. E' stato osservato che le piante di appartamento possono rappresentare una fonte di acquisizione di *S. apiospermum* per i pazienti con FC.

*Exophiala dermatitidis* (*E. dermatitidis*,) lievito nero a 37° e fungo filamentoso a temperatura ambiente, è riscontrabile dall'1,8 al 6% dei pazienti con FC. La variabilità di percentuale di isolamento tra laboratori può dipendere dalla mancanza di standardizzazione delle colture micologiche, riguardo all'utilizzo di terreni selettivi, il tempo di incubazione prolungato (da prolungare sino a 4 settimane). Nel contesto della FC, *E. dermatitidis* può essere responsabile di colonizzazione cronica o transitoria dell'albero respiratorio, generalmente senza segni clinici.

La sua presenza in pazienti con bronchiectasie, può essere considerata, con *Scedosporium* e *Aspergillus*, un biomarker di possibile malattia CFTR-correlata (5).

Altre specie di miceti sono saltuariamente isolate dai campioni di pazienti con FC, come *Scedosporium prolificans*, *Acrophialophora fusispora*, *Paecilomyces* spp, *Penicillium* spp, *Scopulariopsis* spp, *Cladosporium* spp e *Alternaria* spp ma il loro grado patogenicità è ancora da verificare.

Anche i lieviti, come *Candida* spp e *Trichosporon beigelii*, possono causare micosi broncopolmonare allergiche. *Candida albicans* (*C. albicans*) può essere frequentemente ritrovata nell'escreato degli adulti FC. *C. albicans* è in grado di colonizzare il tratto oro-gastro-intestinale e generalmente deve essere considerata come microrganismo commensale. La colonizzazione può essere più frequente nei pazienti sottoposti a terapia antibiotica. E' importante segnalare la sua presenza nelle colture di pazienti in lista di trapianto polmonare per la possibilità che *C.albicans* possa provocare un'infezione necrotizzante bronchiale nel sito dell'anastomosi, anche se abitualmente questi pazienti sono sottoposti a profilassi antimicotica.

Risulta ben chiaro che nei pazienti che sono stati sottoposti a trapianto polmonare la colonizzazione da miceti può avere gravi implicazioni cliniche ed è quindi molto importante che il laboratorio di microbiologia sia in grado di segnalarli correttamente. Nei pazienti trapiantati di polmone, oltre all'aspergillosi invasiva, sono state descritte infezioni fungine invasive fatali da *Candida* spp, *Scedosporium* spp e *Paecilomyces* spp.

### **Infezioni da micobatteri**

La densità delle secrezioni, le patologie ostruttive e le abituali bronchiectasie associate che caratterizzano il polmone FC, creano un ambiente favorevole per la colonizzazione e la successiva malattia invasiva da micobatteri. I principali micobatteri che infettano il tratto respiratorio di pazienti con FC sono i micobatteri non tubercolari (6-13%), principalmente il *Mycobacterium avium* complex (2-4,5%), affiancato da *Mycobacterium abscessus* group (3 - 5%) (6). Benché sia difficile determinare se il paziente FC è solo colonizzato o è infettato da questi micobatteri, vanno sempre ricercati almeno una volta all'anno in quanto si stanno accumulando segnalazioni di pazienti affetti da un apparente innocente colonizzazione da micobatteri che poi sviluppano serie e a volte fatali malattie (7).

Inoltre nei pazienti FC che hanno subito un trapianto polmonare la terapia immunosoppressiva post trapianto aumenta ulteriormente il rischio di sviluppare un'infezione da micobatteri non tubercolari (8-9).





## **LA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA**

La microbiologia della fibrosi cistica è nota come un'attività di nicchia all'interno del vasto panorama della diagnostica microbiologia. I microrganismi coinvolti in questa patologia polmonare sono in genere un numero molto ristretto di patogeni opportunisti che, viste le condizioni estreme dell'habitat di crescita (dovute al particolare microambiente costituito dal polmone FC, ma anche dall'enorme pressione selettiva esercitata dalla terapia antibiotica) hanno spesso caratteristiche particolari a causa di una serie di meccanismi di adattamento.

Per ricordare solo alcuni di questi meccanismi ricordiamo che ceppi ipermutabili si isolano dalle vie respiratorie FC, batteri che hanno un altissimo tasso di mutazioni genetiche. Ciò permette loro di aumentare le possibilità di adattamento a condizioni di crescita particolari. Adattamenti metabolici, con diminuzione di alcune attività per eludere l'azione dei farmaci, ed anche anomalie metaboliche, in genere sfavorenti la crescita dei batteri quali l'incapacità di sintetizzare alcune sostanze (auxotrofismo), viene a trasformarsi in un vantaggio selettivo. Le cellule batteriche stimulate da questo ambiente particolare di crescita si organizzano sfruttando network di comunicazione in architetture particolari (biofilm) producendo una matrice esterna che li protegge dalle difese dell'ospite e dall'azione dei farmaci. Appare quindi chiaro che questa particolare branca della microbiologia diagnostica rappresenta una sfida per il microbiologo che deve contrastare i continui cambiamenti di scena imposti dal continuo adattamento di questi patogeni in grado di escogitare sempre nuovi espedienti per la sopravvivenza. Gli approcci tecnici con cui il microbiologo si avvicina a questo gruppo particolarmente difficile di patogeni polmonari dovranno essere specifici e continuamente aggiornati.



## **PROTOCOLLO PRATICO**

### **TIPOLOGIA DEI CAMPIONI**

#### **Espettorato**

Per i pazienti in grado di produrre espettorato si raccomanda la raccolta preferibilmente il mattino, o comunque a distanza dal pasto, previa esecuzione di un lavaggio orale eseguito con acqua (o soluzione fisiologica) sterile con l'ausilio di uno spazzolino.

#### **Lavaggio bronco alveolare (BAL)**

Per i pazienti non espettoranti, il BAL è la tipologia di prelievo che permette di isolare con maggiore precisione la flora delle vie respiratorie profonde (anche questa tipologia di campioni presenta dei limiti in quanto non sono rappresentativi della flora di tutto il polmone).

#### **Tampone faringeo**

I risultati forniti dall'analisi del tampone faringeo devono essere considerati di scarsa sensibilità, se però si ha cura di eseguirlo correttamente stimolando il colpo di tosse riflette con una certa fedeltà la flora microbica presente nelle basse vie respiratorie (10-11).

#### **Aspirato ipofaringeo**

Vista l'invasività e la difficoltà di eseguire di routine un BAL o un broncoaspirato è accettato per il monitoraggio microbiologico dei pazienti non espettoranti, l'aspirato ipofaringeo, effettuato dopo la seduta fisioterapica, stimolando il colpo di tosse ed impiegando un sondino sterile da aspirazione con una grossa siringa; il sondino viene successivamente reciso entro una provetta sterile o direttamente in un contenitore con un idoneo terreno di trasporto.

### **CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI**

Tutti i campioni devono essere immediatamente consegnati al laboratorio; qualora non sia possibile processarli immediatamente si consiglia di conservarli a 4°C per un massimo di 2 h.

Un ritardo nella processazione può portare alla non evidenziazione dei batteri "fastidious", come *Streptococcus pneumoniae* ed *Haemophilus influenzae*.

Qualora vengano ricevuti campioni che hanno soggiornato in frigorifero o a temperatura ambiente per tempi più lunghi (es: campioni ricevuti per posta), è consigliata l'indicazione nel referto delle limitazioni di un esame eseguito su tali campioni.

### **PERIODICITA' DI ESECUZIONE**

Le indagini microbiologiche nei pazienti FC devono essere eseguite almeno con cadenza trimestrale o al momento della riacutizzazione.

### **ESAME COLTURALE: PROCEDURA**

#### **Preparazione del campione per la semina**

Data la particolare viscosità delle secrezioni bronchiali dei pazienti FC, è sempre consigliabile la fluidificazione dell'espettorato da eseguirsi con omogenizzatori o con l'utilizzo di mucolitici previa separazione della parte più densa del campione (quest'ultimo accorgimento è particolarmente importante per l'esecuzione corretta della conta batterica).



Il ditiotreitolo è consigliato quale mucolitico di prima scelta, alla concentrazione ottimale dello 0,1% in PBS pH 7,2. Prima dell'uso è importante ricordarsi di sterilizzare il ditiotreitolo per filtrazione; a tale scopo si usano filtri millipore 0,22 $\mu$ . E' possibile comunque reperire in commercio il ditiotreitolo in confezioni sterili (Sputasol).

Per quanto riguarda l'acetilcisteina, anch'essa mucolitico di largo uso, esistono alcune evidenze che indicherebbero una certa sua attività inibente sulla crescita batterica.

#### OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

L'esame microscopico dei campioni di espettorato provenienti da pazienti FC non è ritenuta indispensabile: infatti tali pazienti presentano in genere un'espettorazione abbondante e purulenta, già indice di provenienza dalle basse vie respiratorie, che facilmente soddisfa i criteri che definiscono l'idoneità del campione (12).

#### SEMINA

L'indicazione quantitativa della carica batterica è ritenuta indispensabile per il clinico in quanto permette il monitoraggio dell'andamento dell'infezione e l'efficacia della terapia antibiotica.

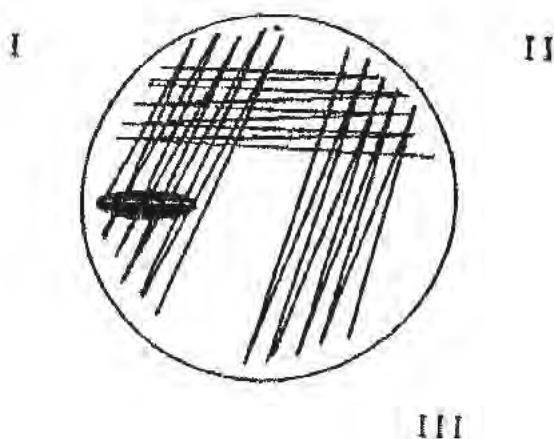
La procedura è di seguito descritta:

1. Seminare il campione dopo fluidificazione con fisiologica sterile operando delle con diluizioni scalari di un esponente  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$
2. Seminare, di ogni diluizione, a partire dal campione indiluito, 100  $\mu$ l su ogni piastra test.

E' consigliata in alternativa la tecnica semiquantitativa messa punto dal Centro Danese FC diretto dal Prof. Høiby:

1. Diluire il materiale più purulento del campione 1:1(v/v) con ditiotreitolo, lasciando il campione per 60 minuti a temperatura ambiente o per 30 minuti in termostato a 35-37°C. Se la carica batterica è elevata si può effettuare un'ulteriore diluizione per facilitare l'isolamento del patogeno.

2. Seminare le piastre usando la tecnica delle "tre zone", depositando 20  $\mu$ l del campione e strisciare 5 linee avanti e 5 linee indietro per ogni quadrante come di seguito indicato:



3. Quantificare la crescita come segue:

carica semiquantitativa	I quadrante	II quadrante	III quadrante	carica <u>approssimativa</u> (CFU/ml) seminando 20 µl (dopo fluidificazione)
+	< 10			10 <sup>3</sup>
++	< 10	< 10		10 <sup>4</sup>
+++	> 10	> 10	< 10	10 <sup>5</sup>
++++	> 10	> 10	> 10	10 <sup>6</sup>

## TERRENI DI COLTURA

Per un efficace isolamento di tutti i potenziali patogeni sono consigliati i terreni sottoelencati:

### terreni indispensabili

-agar MacConkey o analoghi (bacilli gram-negativi)

-agar sale mannite (*S. aureus*)

-agar cioccolato con bacitracina (*Haemophilus* spp.): l'utilizzo del terreno addizionato con bacitracina è particolarmente raccomandato, in quanto l'isolamento di *Haemophilus* spp. in agar cioccolato non selettivo è spesso reso impossibile dalla contemporanea crescita di *P. aeruginosa*.

-agar BCSA (Burkholderia Cepacia Selective Agar): è un terreno selettivo e differenziale indicato in letteratura come uno dei migliori per l'isolamento di *B. cepacia*-complex (13). Il suo uso routinario è da ritenersi indispensabile: infatti in mancanza di un terreno selettivo, la presenza di tale patogeno sfugge all'osservazione perché la sua crescita, piuttosto lenta, è coperta da quella di *P. aeruginosa*. Può essere utile la semina di 100 µl di espettorato fluidificato sul BCSA al fine di aumentare la sensibilità della ricerca di *B. cepacia*-complex nei pazienti non colonizzati.

-agar BCSA, utilizzo aggiuntivo (*M. abscessus* e *M. chelonae*) La buona selettività di questo terreno non impedisce tuttavia la crescita di altri microrganismi: in particolare dei Micobatteri a rapida crescita (RGM).

Questa parziale selettività del terreno ci permette di evidenziare la crescita di *M. abscessus* e *M. chelonae* dopo un periodo di incubazione di 5 / 15 gg a temperatura ambiente.

-agar CNA (cocchi gram-positivi, in particolare *S. pneumoniae*)

-agar sangue (terreno a libera crescita)

-agar Sabouraud addizionato di antibiotici (es cloramfenicolo + gentamicina) (miceti): l'uso di tale terreno è da ritenersi routinario per la ricerca di funghi filamentosi e lieviti.

Recentemente è stato dimostrato come il mancato uso di un terreno specifico per i funghi negli espettorati dei pazienti con FC sottostima l'incidenza dei miceti. Invece, le colture micologiche con antibiotici, incrementano del 60% il numero di miceti che possono essere isolati.

E' importante, una volta seminato nel terreno micologico il campione non diluito, sigillare la piastra con una striscia di parafilm per evitare sia l'essiccamento del terreno che la contaminazione crociata di piastra a piastra.



## MODALITA' DI INCUBAZIONE

-incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO<sub>2</sub> (5-10%) per 24 ore: Agar cioccolato con bacitracina e Agar CNA.

-esaminare le piastre sopra menzionate dopo 24 ore e procedere ad identificazioni e/o isolamenti;

-re-incubare, in caso di negatività, le piastre di Agar CNA e di Agar cioccolato con bacitracina, e riesaminarle dopo altre 24 ore;

-incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 48 ore: Mc Conkey Agar, Agar sangue, Agar sale mannite, Agar BCSA e Agar Sabouraud addizionato di cloramfenicolo e gentamicina;

-re-incubare, in caso di negatività, le piastre di Agar Mc Conkey, Agar sangue, Agar BCSA e riesaminarle dopo altre 24 ore;

-Per *B. cepacia*-complex (BCSA) l'incubazione può essere prolungata fino ad una settimana (i primi 3-4 giorni a 35-37°C e poi a temperatura ambiente).

-Per *M. abscessus* e *M. chelonae* incubare le piastre di BCSA i primi 3 gg a 37°C e poi a temperatura ambiente per un massimo di 15 gg.

- Per i funghi filamentosi, re-incubare il Sabouraud per 3 settimane a temperatura ambiente, osservandolo per la 1<sup>a</sup> settimana ogni 48 ore e poi ogni 7 gg, poiché alcuni miceti possono richiedere per svilupparsi un tempo prolungato

Riassumendo: l'incubazione di tutte le piastre deve essere protratta per due giorni a 35-37°C. Per l'isolamento di microrganismi a lenta crescita (es: *Achromobacter xylosoxidans*, *B. cepacia*-complex, *Burkholderia gladioli* (*B. gladioli*), *Pandoraea spp.*, *Ralstonia spp.*, *S. maltophilia*, alcuni ceppi di *P. aeruginosa* fenotipo mucoido e di *P. aeruginosa Small Colony Variant*) è necessario protrarre l'incubazione del terreno idoneo per tre giorni. Per *B. cepacia*-complex l'incubazione può essere prolungata fino ad una settimana (i primi 3-4 giorni a 37°C e poi a temperatura ambiente). Per *M. abscessus* e *M. chelonae* l'incubazione può essere prolungata fino a 15gg (i primi 3 giorni a 37°C e poi a temperatura ambiente).

## INDICAZIONI PROCEDURALI CRITICHE

### *Pseudomonas aeruginosa*

*P.aeruginosa* è il patogeno principale nei pazienti con FC. Inizialmente questo microrganismo aderisce all'epitelio polmonare difettivo e forma micro-colonie, successivamente invade tutto il polmone formando il biofilm. Durante il processo che inizia con l'acquisizione e termina con la colonizzazione cronica *P. aeruginosa* va incontro a fenomeni di conversione fenotipica irreversibili: alcuni ceppi diventano rugosi e LPS difettivi, altri si trasformano in una forma fenotipica, priva di flagello, detta mucoido per la produzione di copiose quantità di alginato, un esopolisaccaride composto da acido glucuronico e mannuronico; altri ceppi diventano iperpiliati e crescono in coltura molto lentamente sotto forma di colonie a morfologia piccola, *Small Colony Variant* (SCV). Sono frequenti anche varianti fenotipiche prive del caratteristico pigmento di *P.aeruginosa* (piocianina e pioverdina) e varianti auxotrofe.

Quindi è molto frequente osservare nelle colture espettorato dei pazienti FC, in particolare quelli con infezione cronica, i fenotipi sopra descritti. E' importante sapere che tali varianti possono manifestare una diversa sensibilità agli agenti chemioterapici. E' quindi indispensabile differenziare, ove presenti, i morfotipi "non mucoidi", "mucoidi" e SCV, ed eseguire gli antibiogrammi separatamente in quanto ogni morfotipo può presentare un diverso pattern di chemiosensibilità. Recentemente i ceppi di *P.aeruginosa* SCV sono in aumento, favoriti nella loro emergenza dalle terapie inalanti con aminoglicosidi a cui i pazienti sono frequentemente sottoposti. I ceppi di *P.aeruginosa* SCV sono caratterizzati da colonie puntiformi, dopo 48 -72 ore di



incubazione su MacConkey agar; questi ceppi sono caratterizzati da elevata antibiotico resistenza, in particolare agli aminoglicosidi e in qualche caso da pan-resistenza.

L'identificazione fenotipica dei ceppi di *P. aeruginosa*, non-mucoidi e mucoidi isolati da FC si basa sulla prova dell'ossidasi e la produzione di pigmento. Per l'identificazione biochimica, in particolare dei ceppi non pigmentati e SCV si consigliano le gallerie API (API 20 NE) della ditta Biomerieux, che vanno incubate a 30° C per 48 ore. Queste gallerie permettono di protrarre l'incubazione anche per 72 ore per i ceppi che dimostrano una crescita particolarmente lenta. I sistemi automatizzati commerciali generalmente si sono dimostrati inadatti all'identificazione biochimica dei ceppi di *P. aeruginosa* mucoidi, SCV e auxotrofi. Nel caso di ceppi non pigmentati di difficile identificazione fenotipica utilizzare metodiche molecolari per l'identificazione di specie e inviare i ceppi ad un centro di riferimento.

### **Test di chemiosensibilità**

I test di sensibilità agli antibiotici di *P. aeruginosa* presentano alcune criticità per i ceppi "mucoidi" e "SCV" e "auxotrofi". Per questi fenotipi è consigliato utilizzare la metodica di sensibilità in terreno solido (disco-diffusione o Etest in Mueller-Hinton agar) con incubazione a 35°C per 24 o 48 ore se la crescita è scarsa a 24 ore. Per i ceppi mucoidi l'inoculum batterico dovrà essere pari a 1 della scala di McFarland. Per i ceppi auxotrofi che non crescono in Mueller-Hinton agar semplice si può provare ad utilizzare Mueller-Hinton agar sangue per le prove di sensibilità.

E' importante ricordare che per la terapia antibatterica delle riacutizzazioni polmonari dei pazienti con FC vengono spesso utilizzati antibiotici somministrati per via aerosol, attualmente tobramicina e colistina. Con questa via di somministrazione i farmaci arrivano nel polmone con una concentrazione molto più elevata, da 10 a 25 volte maggiore di quella normalmente ottenibile con la somministrazione per via sistemica. Può essere utile monitorare la sensibilità tobramicina anche ad alti livelli e a questo scopo sono disponibili e strisce di Etest con un range di concentrazione di antibiotico più ampio (da 0.016 a 256 mcg/ml). Testare la colistina su tutti i ceppi di *P. aeruginosa* isolati da FC allo scopo di monitorare l'eventuale emergenza di ceppi non sensibili.

### **Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA)**

*Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) è un patogeno nosocomiale isolato con frequenza crescente anche da pazienti FC. Tale microrganismo costituisce un notevole problema clinico in quanto è sensibili solo a pochissimi agenti chemioterapici: è quindi di fondamentale importanza effettuare, oltre ad una corretta identificazione (classiche tecniche biochimiche o test di agglutinazione), anche un'altrettanto corretta valutazione della meticillino-resistenza.

Tale resistenza può essere valutata con metodi diversi: infatti oltre alle metodiche classiche agar e brodo diluizione, attualmente sono disponibili anche test di screening su piastra.

E' noto che l'espressione della meticillino-resistenza è notevolmente influenzata dalle condizioni con cui il test è eseguito, ed in particolare:

il tipo di antibiotico con cui la, deve essere valutata resistenza è:

- oxacillina ad una concentrazione di 6 µg/ml se si utilizza come metodo il test di Agar diluizione,
- oxacillina ad una concentrazione di 1µg se si utilizza come metodo il test di Disco diffusione
- cefoxitina ad una concentrazione di 30µg se si utilizza come metodo il test di Disco diffusione



Secondo il CLSI la resistenza ad oxacillina si deve evidenziare usando (14):

1. **Test di Agar diluizione** Esistono in commercio piastre addizionate di antibiotico, 6µg/ml, (es. MRSA screen Ditta BD, Oxa screen Ditta BioMerieux) da utilizzare come test di screening
  - **Metodo Agar screen**
  - Medium: Agar screen
  - Inoculum: secondo il metodo Standard raccomandato per il test di disco diffusione (0,5 McFarland), con un tampone strisciare un quadrante
  - Temperatura e atmosfera di incubazione: 33-35°C in ambiente aerobio
  - Tempo di incubazione: 24 ore
  - Risultati: >1 colonia = oxacillina resistente
  
2. **Test di Disco Diffusione (DD)** Si esegue utilizzando un disco di oxacillina da 1µg e/o di un disco di cefoxitina da 30µg. In *S. aureus*, il disco di cefoxitina è un indicatore migliore del disco dell'oxacillina.
  - Metodo di DD**
  - Medium: MHA
  - Concentrazione antibiotico: disco di oxacillina da 1 µg
  - Concentrazione antibiotico: disco di cefoxitina da 30 µg
  - Inoculum: secondo il metodo Standard raccomandato per il test di disco diffusione (0,5 McFarland)
  - Temperatura e atmosfera di incubazione: 33-35°C in ambiente aerobio
  - Tempo di incubazione: 24 ore
  - Risultati: ≤ 10 mm per il disco di oxacillina = **Oxacillina Resistenza = MRSA**
  - ≤ 21 mm = il disco di Cefoxitina = **Oxacillina Resistenza = MRSA**

N.B. : si può evidenziare in casi rari, un meccanismo di resistenza diverso dal *mecA*, quindi i ceppi con *mecA* e PBP 2a negativi e MIC di oxacillina  $\geq 4$  µg/ml, devono essere riportati come oxacillina resistenti. Questi ceppi possono risultare sensibili a cefoxitina con il test di disco diffusione.

Soltanto il rispetto di tutte queste condizioni è infatti in grado di evidenziare la meticillino-resistenza in tutti i ceppi di *Stafilococchi*.

#### **Staphylococcus aureus "Small Colony Variant" (SCVs)**

Date le loro caratteristiche biochimiche (auxotrofismo per emina, menadione e/o timidina), queste varianti fenotipiche sono caratterizzate da crescita lenta con colonie piccole (1/10 delle colonie wild type), non pigmentate, non emolitiche. Questi ceppi possono essere identificati a livello di specie utilizzando preferibilmente metodiche per l'identificazione biochimica manuali (API STAPH) e con la latex agglutinazione (es Pastorex Staph Aurex). Sono ceppi altamente resistenti agli antibiotici, in particolare alla gentamicina per lo scarso assorbimento del farmaco e al cotrimossazolo per i ceppi timidino-dipendenti. Per il loro isolamento ottimale si richiede l'incubazione dei terreni specifici (agar sale mannite) per almeno 72 ore. Tali varianti non crescono su Mueller-Hinton Agar. Non ci sono metodi approvati per determinare i profili di suscettibilità delle SCVs. I più utilizzati sono la disco-diffusione secondo il CLSI e l'Etest utilizzando Mueller-Hinton Agar



addizionato di sangue di montone al 5%. Alcuni ceppi particolarmente esigenti crescono solo su Agar sangue (15).

#### **Test per la resistenza ai glicopeptidi**

Su tutti gli isolati di *S. aureus* è indicato l'esecuzione di uno screening per il test della resistenza ai glicopeptidi inoculando piastre specifiche.

#### **Secondo il CLSI la resistenza a Vancomicina si deve evidenziare usando (14):**

-**Test di Agar diluizione** Esistono in commercio piastre addizionate di antibiotico, 6µg/ml di vancomicina, (es. il VA screen ditta B.D.) da utilizzare come test di screening

-**Metodo test:** Agar Diluizione

-Medium: Brain Heart Infusion agar (BHI)

-Concentrazione antibiotico: 6 µg/ml di Vancomicina

-Inoculum: Allestire una sospensione batterica di torbidità pari allo 0,5 McFarland, depositare 10 µl di sospensione sulla superficie dell'agar, oppure strisciare un tampone, imbibito nella sospensione batterica e spremuto contro le pareti della provetta, per un area di circa 10-15 mm di diametro.

-Temperatura e atmosfera di incubazione:  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  in ambiente aerobio

-Tempo di incubazione: 24 ore

-Risultati: >1 colonia = presuntiva ridotta sensibilità a vancomicina

Questo test non è idoneo ad evidenziare tutti i valori di Vancomicina – intermedi (Break Point di vancomicina =  $\leq 2$  S; 4 I; 8 I; 16 R;  $\geq 32$  R), infatti avendo una concentrazione di antibiotico pari a 6µg/ml, gli isolati con MIC pari a 4µg/ml e quindi intermedi potrebbero non crescere. In tal caso è necessario valutare la MIC con un sistema E-Test o micro diluizione in brodo.

#### **Burkholderia cepacia complex**

##### **Isolamento**

La diagnosi precoce ed accurata della prima colonizzazione da *B. cepacia* complex è di vitale importanza in quanto i pazienti colonizzati devono essere isolati per evitare infezioni crociate.

Per l'isolamento di *B. cepacia* complex è indispensabile utilizzare medium selettivi, ne esistono diversi in commercio quali B. Cepacia Selective Agar (BCSA), Cepacia Medium Agar (CM) Pseudomonas cepacia Agar (PC), Oxidative-Fermentative-Polymyxin-Bacitracin-Lactose Agar (OFPL). La specificità di questi terreni è la seguente: BCSA > CM > PC > OFBL.

E' essenziale prolungare il periodo di incubazione dei terreni selettivi fino ad una settimana come indicato nei capitoli precedenti.

Come per gli altri microrganismi descritti, anche *B. cepacia* complex che appartengono alla stessa sottospecie, possono presentare variabilità fenotipica con morfologie diverse delle colonie e SCV che devono essere testate separatamente per la chemiosensibilità.

##### **Identificazione biochimica**

L'identificazione dei microrganismi che appartengono a *B. cepacia* complex presenta notevoli difficoltà. In particolare per quanto riguarda i sistemi automatizzati i database in commercio sono spesso incompleti. Sia le gallerie di test biochimici manuali che i metodi automatizzati forniscono quindi spesso risultati errati, dovrebbero essere considerati sospetti per *B. cepacia* complex le identificazioni che danno come risultato: *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Vibrio* spp.





### Test di chemiosensibilità

Il profilo di chemiosensibilità di *B. cepacia* complex è in genere caratteristico per alcune classi di farmaci, è quindi sempre consigliabile di controllare la concordanza fra identificazione e profilo di sensibilità. A tale scopo la tabella seguente riporta il profilo di chemiosensibilità di *B. cepacia* complex e di altri microrganismi simili dal punto di vista fenotipico e biochimico spesso confusi con *B. cepacia* complex.

Microrganismo	colistina	ticarcillina	aminoglicosidi	imipenem	meropenem
<i>B. cepacia</i> complex	R	R	R	R (I,S)	R (MEM>IMP)
<i>B. gladioli</i>	R	I,S	S	S	S (IMP>MEM)
<i>Pandorea</i> spp.	R	R	R	S	R
<i>Ralstonia mannitolitica</i>	R	R	R	I,S	R
<i>Ralstonia pickettii</i>	R	S	R	S	n.d.

### Identificazione molecolare

La conferma dell'identificazione biochimica e l'identificazione delle varie sottospecie di *B. cepacia* complex è possibile solo con un approccio molecolare specifico. Tale tecnica prevede l'utilizzo di tecnici approcci diversi, fra i più utilizzati: amplificazione di frammenti del gene *recA* specifici per il *B. cepacia* complex e per le varie sottospecie, analisi di restrizione RFLP con digestione enzimatica del gene *recA*, amplificazione e sequenziamento del gene *recA* e di altri frammenti genici (16-17-18 <http://www.ibcsg.org>).

L'identificazione molecolare è da eseguirsi esclusivamente da parte di laboratori specialistici di riferimento.

Si consiglia l'identificazione molecolare:

- 1) Al momento della prima colonizzazione per confermare che il microrganismo appartenga a *B. cepacia* complex ed identificare la sottospecie.
- 2) Almeno una volta l'anno nel caso di pazienti colonizzati cronicamente per verificare che il microrganismo sia sempre lo stesso. Si possono infatti verificare variazioni nella sottospecie colonizzante con tendenza a rimpiazzare i genomovar meno aggressivi con quelli più virulenti.

L'identificazione molecolare è indispensabile in caso di pazienti in lista di trapianto polmonare. La colonizzazione con alcuni genomovar più aggressivi quali il III (*B. cenocepacia*) è infatti considerata da alcuni centri una controindicazione per il trapianto stesso.

### *Stenotrophomonas maltophilia* e *Achromobacter xylosoxidans*

Sebbene il loro ruolo patogeno nella malattia polmonare non sia ancora perfettamente definito, sono sempre più numerose in letteratura le segnalazioni che sottolineano un aumento nella frequenza di isolamento di *S. maltophilia* e *A. xylosoxidans* in pazienti con fibrosi cistica. L'ampia variabilità nei tassi di prevalenza (1-30%) nei diversi centri è in parte da attribuire alle diverse capacità diagnostiche dei laboratori di microbiologia. Anche per *S. maltophilia*, come già osservato per altri patogeni, sono stati descritti nella popolazione fc isolati SCV, auxotrofi per emina, timidina e metionina, che possono porre numerosi problemi sia per la identificazione che per la valutazione della sensibilità.

### Identificazione biochimica e molecolare di *Stenotrophomonas maltophilia*

Il recupero di *S. maltophilia* dalla coltura delle secrezioni delle vie aeree in alcuni casi può essere laborioso, soprattutto per la presenza concomitante di altri patogeni a crescita più rapida e con carica elevata.



In generale, i medium di coltura usati di routine, come agar con emazie di montone e agar McConkey, supportano la crescita di *S. malthophilia*, sebbene alcuni ceppi siano particolarmente esigenti e richiedano fattori di crescita come emina, metionina e acido nicotinico.

L'uso di terreni selettivi aumenta il tasso di isolamento di questo microrganismo.

Il VIA medium, un terreno contenente vancomicina, imipenem e amphotericina B come agenti selettivi, ha dimostrato una sensibilità maggiore nel recupero di *S. malthophilia*. L'incubazione a

temperatura di  $35 \pm 2$  °C deve essere protratta per 5 giorni, con ispezione giornaliera delle piastre ed eventuale subcultura su terreni arricchiti.

L'identificazione fenotipica di isolati suggestivi per *S. malthophilia* è basata su alcune proprietà:

- ossidasi (in genere i ceppi sono, nella maggior parte dei casi, negativi al test dell'ossidasi)
- attività deossiribonucleasica per produzione extracellulare di Dnasi.

Il Dnase Test agar con verde di metile (Difco) è un test semplice, alla portata di tutti i laboratori, che permette di discriminare *stm* da altre specie di bacilli gram-negativi non fermentanti.

È un test semplice che permette di discriminare *stm* da altre specie di bacilli gram-negativi non fermentanti. Al fine di evitare errate identificazioni per risultati falsamente negativi, l'attività deossiribonucleasica su Dnase Test agar con verde metile (Difco) deve essere valutata a 48 e a 72 h di incubazione a  $35 \pm 2$  °C.

La comparsa di un alone trasparente che circonda la colonia indica una reazione positiva.

Il sistema API 20NE (Biomérieux) provvede all'identificazione accurata (very good identification) della maggior parte di isolati clinici di *S. malthophilia*, con una performance leggermente superiore ai sistemi automatici. Le gallerie richiedono una incubazione a 30°C per 48 h. Per superare i problemi di identificazione associati a ceppi "problematici" con i metodi convenzionali, il sequenziamento del gene 16SrRNA o 23S rRNA, che ha mostrato una sensibilità e specificità del 100%, può essere una risorsa importante, naturalmente per quei laboratori che posseggono strumentazione adeguata e personale dedicato.

#### **Chemiosensibilità di *Stenotrophomonas maltophilia***

*S. malthophilia* è resistente a differenti classi di antimicrobici. All'espressione di diversi meccanismi di resistenza sia innati che acquisiti, è da attribuire la resistenza ai betalattami, ai chinoloni, ai carbapenemi, alle cefalosporine, anche se alcuni ceppi sono sensibili al ceftazidime. Doxyciclina, cloramfenicolo e ticarcillina con acido clavulanico sono i farmaci più attivi, inibendo l'80%, 70% e 50% degli isolati, rispettivamente. trimetoprim/sulfametossazolo (TSM), a lungo il farmaco di scelta nel trattamento delle infezioni da *S. malthophilia*, è attivo in una percentuale variabile dal 14,5% al 34,4%. La resistenza a TSM per acquisizione dei geni *sul* è segnalata con frequenza sempre maggiore in tutti i Paesi.

I ceppi SVC di *S. malthophilia* non crescono su CAMHA; pertanto, per l'antibiogramma occorre usare l'agar cioccolato e una incubazione a 35-37°C per 48 h, sebbene il metodo non sia standardizzato (19).

#### **Identificazione biochimica e molecolare di *Achromobacter xylosoxidans***

In generale, i terreni di coltura usati routinariamente nella processazione delle secrezioni respiratorie di pazienti fc, soprattutto agar cioccolato e agar McConkey, supportano bene la crescita di *ax*. È anche frequente osservare il recupero di questo microrganismo su *Burkholderia Cepacia* Selective Agar (BCSA).

Data la frequente ricorrenza di errata identificazione, particolare attenzione deve essere posta all'identificazione accurata. L'errata attribuzione di questo patogeno al genere *Burkholderia*, e viceversa, può avere importanti ripercussioni sia sul piano clinico che sul piano epidemiologico.

Il sistema API 20NE si è rivelato un ottimo sistema per la definizione di specie di bacilli Gram-negativi, non fermentanti, ossidasi-positivi che esibiscono proprietà fenotipiche suggestive per *A. xylosoxidans*.



Le gallerie devono essere incubate a 30°C e lette dopo 24-48 h; in alcuni casi è opportuno ripetere la lettura dopo ulteriori 24 ore di incubazione.

I sistemi automatici (Vitek 2 o Microscan) in commercio hanno mostrato nel complesso una performance buona, ma lievemente inferiore ai metodi manuali.

Alcuni ceppi particolarmente “fastidious” richiedono un approccio genotipico.

#### **Chemiosensibilità di *Achromobacter xylosoxidans***

I ceppi sono resistenti agli aminoglicosidi, alle cefalosporine di 1° e 2° generazione, al cloramfenicolo, ai chinoloni; il 50% circa è sensibile a ceftazidime, piperacillina, ticarcillina, minociclina, trimetoprim/sulfametossazolo, ai carbapenemi, sebbene in letteratura sono sempre più frequenti le segnalazioni di isolati resistenti a imipenem e meropenem per produzione di carbapenemasi di classe VIM e IMP. Fortunatamente solo un piccolissimo numero di ceppi è resistente a 100-200 µgr/l di colistina.

#### **Mycobacterium tuberculosis**

Per la ricerca dei micobatteri tubercolari, data l’alta infettività correlata alla bassa dose infettante per l’uomo (50% della dose infettante <10 bacilli) e il documentato elevato rischio per il personale di laboratorio è necessario che il materiale venga indagato presso un Servizio di micobatteriologia di livello 2 o Regionale che possa garantire una diagnostica adeguata sia per l’identificazione che per l’antibiogramma (20-21). È consigliabile che almeno una volta all’anno venga eseguita una ricerca per micobatteri tubercolari su tre campioni di espettorato eseguiti in giorni diversi (22).

Nei pazienti FC colonizzati da *P. aeruginosa* l’isolamento dei micobatteri presenta notevoli problemi tecnici in quanto tale batterio può sopravvivere alla decontaminazione eseguita con il metodo tradizionale: è quindi consigliabile in questi casi ricorrere all’utilizzo di acido ossalico in aggiunta alla normale decontaminazione.

L’esame batterioscopico può essere eseguito previa colorazione di Kinyoun (Ziehl-Neelsen modificata) o con colorazione fluorocromica (Auramina e sue varianti) (23).

#### **Mycobacteria non tubercolari a rapida crescita (*M. abscessus* e *M. chelonae*)**

Anche per la ricerca dei RGM è consigliabile far riferimento ad un Servizio di micobatteriologia di livello 2 o Regionale che possa garantire una diagnostica adeguata sia per l’identificazione che per l’antibiogramma.

##### **Isolamento**

Il *M. abscessus* e *M. chelonae* appartengono al gruppo dei micobatteri non tubercolari a rapida crescita (RGM.) e sono rappresentati da colonie ben visibili in circa 7 giorni, se sottocolturate su terreni adatti.

Oltre alle procedure classiche per la ricerca dei Micobatteri, *M. abscessus* e *M. chelonae*, crescono facilmente su terreno selettivo per *B. cepacia* complex, il BCSA. (ditta BioMerieux)

##### **Procedura:**

- Seminare 0,1 ml del campione precedentemente fluidificato utilizzando pipette sterili in plastica monouso su terreno BCSA.
- Incubare a 35°C per 48 ore in atmosfera aerobia e successivamente porre le piastre a temperatura ambiente per altri 5/15 gg.
- Nel caso di positività per *M. abscessus/chelonae* le colonie appaiono piccole non pigmentate, mucose o rugose biancastre dal caratteristico odore di “cantina-muffa”.
- Riseminare su agar sangue tutte le colonie sospette per la successiva identificazione mediante tecniche di biologia molecolare e per la valutazione dei test di sensibilità agli antibiotici.



### Test di chemiosensibilità

*M. abscessus* e *M. chelonae*, sono resistenti alla maggior parte dei farmaci antitubercolari, mentre possono essere sensibili ad alcuni farmaci non comunemente usati nei laboratori di micobatteriologia

I ceppi sono resistenti alla pefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina, sulfametossazolo e alle doxicicline, ma generalmente sono sensibili alla claritromicina alla azitromicina e all'imipenem e amikacina. La sensibilità a linezolid è variabile a seconda del ceppo batterico, sembra inoltre che *M. abscessus* sia più resistente a queste molecole di *M. chelonae*.

I ceppi di *M. abscessus* sono generalmente sensibili all'amikacina e alle cefoxitine, mentre i ceppi di *M. chelonae* sono generalmente resistenti. Al contrario i ceppi di *M. chelonae* sono generalmente sensibili alla tobramicina, mentre *M. abscessus* è resistente a questo antibiotico. La claritromicina, (o azitromicina) e l'amikacina sono gli antibiotici più attivi e utilizzati, anche se sono state osservate resistenze acquisite attraverso mutazioni.

### Identificazione molecolare

I sistemi identificativi classici che sfruttano il metabolismo batterico non sono in grado di differenziare *M. abscessus* da *M. chelonae*, si deve quindi ricorrere a tecniche di biologia molecolare.

In commercio esistono tre sistemi di identificazione basati sull'uso di sonde molecolari (24):

- AccuProbe (Gen-Probe, BioMerieux) Genotype® Mycobacterium (Hein), Genotype® MTBC Hein) e INNO LiPA Mycobacteria (Innogenetics), tutti utilizzabili a partire da organismi cresciuti sia in terreno liquido che solido
- PCR Restriction Analysis (PRA) tecnica home made
- Sequenziamento genico

### Haemophilus influenzae

Ceppi non capsulati di *H. influenzae* sono frequentemente isolati dal tratto respiratorio di pazienti FC. *H. influenzae* non colonizza cronicamente le vie aeree e solo occasionalmente persiste per oltre 6 mesi. La persistenza sembra essere associata alla presenza di ceppi ipermutabili, multi resistenti (25) e ad una esacerbazione della malattia polmonare.

La variabile prevalenza di questo microrganismo, può essere imputabile al non utilizzo, per la crescita, del terreno selettivo. Senza tale terreno la presenza di *P. aeruginosa* potrebbe oscurarne la crescita. In letteratura la prevalenza è riferita essere il 34% sia nella popolazione adulta che in quella pediatrica (26).

Una corretta identificazione di questo microrganismo può essere eseguita basandosi sulla richiesta per la crescita dei fattori X (emina) e V (NAD), oppure mediante l'utilizzo di gallerie biochimiche di identificazione (Remel, Oxoid, API NH, BioMerieux).

### **Secondo il CLSI 2009 gli antibiotici da saggiare sono definiti nella tabella sottostante (14):**

Gruppo A = da saggiare sempre e da refertare sempre:

Ampicillina, Cefotaxime\* o Ceftazidime\* o Ceftriaxone\*, Cloramfenicolo, Meropenem

Gruppo B = da saggiare sempre e da refertare selettivamente

Un antibiotico orale, (es. Ampicillina/Acido Clavulanico, Cefaclor)

\* Se risultano NON sensibili, confermare con altro test

### Procedura

Medium: Disco Diffusione: Haemophilus Test Medium (HTM) montone  
Brodo diluizione: HTM brodo



Inoculum: Sospensione diretta da colonia pari allo standard turbidimetrico 0.5 McFarland  
Incubazione: 35 ± 2°C;  
Disco Diffusione: 5% CO<sub>2</sub>, 16-18 ore  
Brodo diluizione: ambiente aerobio; 20-24 ore

E' possibile saggiare la sensibilità ad ampicillina mediante l'utilizzo del disco di nitrocefina che evidenzia la produzione di β lattamasi.

### *Streptococcus pneumoniae*

La prevalenza di *S. pneumoniae* nei pazienti FC è, circa, del 5-10%, l'isolamento è più frequente nei bambini al di sotto dei 10 anni di età. L'infezione o colonizzazione è solitamente transiente, ma è spesso associata ad esacerbazioni della patologia polmonare. La maggior parte dei pazienti è infettata con un unico clone, in un studio condotto in Spagna è stato evidenziato un clone multi resistente prevalente nella popolazione, appartenente al sierotipo 23F (27).

Una identificazione corretta, per la maggior parte degli isolati di pneumococco può essere eseguita utilizzando il test della solubilità in bile e la sensibilità all'optochina.

Il largo uso di terapia antimicrobica con β lattamici e macrolidi induce un aumento di resistenza, che compromette il successo terapeutico. Si raccomanda pertanto di saggiare la resistenza di *S. pneumoniae* alla penicillina su tutti gli isolati.

**Secondo il CLSI 2009 gli antibiotici da saggiare sono definiti nella tabella sottostante (14):**

Gruppo A = da saggiare sempre e da refertare sempre:

Eritromicina, Penicillina, Trimetoprim/Sulfametossazolo

Gruppo B = da saggiare sempre e da refertare selettivamente

Cefotaxime, Ceftriaxone, Meropenem e levofloxacina

La sensibilità a Penicillina si testa mediante l'uso di un disco di oxacillina da 1 µg. Se la zona di inibizione è ≤19 mm, la sensibilità di Penicillina o Cefotaxime o Ceftriaxone o Meropenem deve essere determinata mediante la Minima Concentrazione Inibente

#### Procedura

Medium: Disco Diffusione: MHA con 5% sangue di montone

Brodo diluizione: CAMHB con LHB (2.5 – 5% v/v)

Inoculum: Sospensione diretta da colonia pari a 0.5 McFarland

Incubazione: 35 ± 2°C; 5% CO<sub>2</sub> per 20-24 ore

### Miceti

#### **Isolamento e identificazione microscopica.**

Allo stato attuale non esiste una standardizzazione delle procedure per l'esame micologico dei campioni delle vie aeree dei pazienti con Fibrosi Cistica. Il mancato utilizzo di terreni selettivi, così come tempi d'incubazione insufficienti possono compromettere il ritrovamento di alcune specie come *S. apiospermum*, che spesso è associato ad *A. fumigatus*, di più rapida crescita. (28)

L'identificazione si basa sull'aspetto morfologico macroscopico delle colonie fungine e sulle caratteristiche microscopiche riscontrate all'esame a fresco con blu di cotone lattofenolo.

Per favorire l'identificazione è consigliabile eseguire sub-colture su terreni minimali (es Potato Dextrose Agar), anche se l'uso del terreno di isolamento, Sabouraud addizionato di antibiotici, per effettuare le sub-colture è altrettanto efficace. L'incubazione a 25-30 °C deve essere protratta per una-due settimane (in particolare i miceti dematiacei hanno una crescita più lenta di quelli ialini). (29)



### Test di chemiosensibilità

I test di chemiosensibilità agli antifungini dei miceti filamentosi non devono essere eseguiti routinariamente negli isolati da FC. Nel caso in cui venga richiesto di approfondire il profilo di sensibilità di ceppi fungini coinvolti in infezioni, gli isolati devono essere inviati a centri di riferimento.

E' da considerare che alcune specie fungine possono essere altamente farmaco-resistenti *in vitro* e/o *in vivo*. *A.fumigatus* è intrinsecamente resistente al fluconazolo ma, l'itraconazolo e il

voriconazolo sono sensibili sia *in vitro* che *in vivo*. *A.terreus* è altamente resistente all'amfotericina B sia *in vitro* che *in vivo*. *S.apiospermum* è resistente *in vitro* a miconazolo, itraconazolo, voriconazolo e caspofungina, inoltre le MICs di amfotericina B sono spesso elevate e corrispondono ad un'inefficacia del trattamento delle infezioni. *S.prolificans* è resistente a quasi tutti gli antimicotici disponibili (30).

### VALUTAZIONE DELLA CHEMIOSENSIBILITA'

Data l'elevata refrattarietà al trattamento antibiotico delle riacutizzazioni polmonari in fc, nella pratica clinica è frequente che al microbiologo sia richiesto di testare molecole antimicrobiche "inusuali", per le quali non esistono valori di breakpoint. In questi casi è sempre opportuno annotare sul referto che il metodo non è raccomandato e che per quella determinata combinazione patogeno-antibiotico non è possibile definire la categoria clinica (Sensibile, Resistente o Intermedio) poiché mancano gli standard interpretativi.

Gli antibiotici, che devono essere testati per i gram- non fermentanti sono indicativamente i seguenti:

#### AMINOGLICOSIDI

netilmicina  
tobramicina  
gentamicina  
amikacina

#### β-LATTAMICI

imipenem  
meropenem  
piperacillina  
pipera/tazobactam  
ceftazidime  
cefepime  
aztreonam  
ticarcillina/clavulanato

#### CHINOLONICI

ciprofloxacina  
levofloxacina

#### ALTRI

cotrimossazolo  
rifampicina  
cloramfenicolo  
minociclina  
tigeciclina  
colistina  
polimixina B

Si ricorda che secondo raccomandazioni internazionali (31) e il CLSI 2009 (14) i metodi raccomandati per eseguire i test di sensibilità sono:

#### *P. aeruginosa*

- disco diffusione
- brodo diluizione
- agar diluizione
- E-test

La sensibilità di *P. aeruginosa* deve essere letta dopo 16-18 ore di incubazione a 35 ±2°C in ambiente aerobio per la disco diffusione, mentre per la brodo diluizione, l'agar diluizione, e l'E-test deve essere letta dopo 16-20 ore.



Nei casi di stipiti a lenta crescita (es: SCV) protrarre l'incubazione fino ad un massimo di 24 ore prima della lettura.

Utilizzando il sistema E-test e metodi in diluizione è possibile saggiare i seguenti antibiotici:

	S	I	R
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32
Cefepime	≤ 8	16	≥ 32
Atreonam	≤ 8	16	≥ 32
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Levofloxacina	≤ 2	4	≥ 8
Piperacillina/ Tazobactam	≤ 64/2	-	≥ 128/2
Ticarillina / Acido Clavulanico	≤ 64/2	-	≥ 128/2
Piperacillina	≤ 64/2	-	≥ 128/2
Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
Tobramicina	≤ 4	8	≥ 16
Amikacina	≤ 16	32	≥ 64
Colistina	≤ 2	4	≥ 8

Standards di riferimento delle MIC (µg/L) per *Pseudomonas aeruginosa*

Per disco diffusione esistono i valori di riferimento per i seguenti antibiotici:

	S	I	R
Ticarillina / Acido clavulanico	≥ 20	15-19	≤ 14
Ceftazidime	≥ 18	15-17	≤ 14
Cefepime	≥ 18	15-17	≤ 14
Ceftriaxone	≥ 21	14-20	≤ 13
Aztreonam	≥ 22	16-21	≤ 15
Imipenem	≥ 16	14-15	≤ 13
Meropenem	≥ 16	14-15	≤ 13
Ciprofloxacina	≥ 21	16-20	≤ 15
Levofloxacina	≥ 17	14-16	≤ 13
Piperacillina/Tazobactam	≥ 18	-	≤ 17
Ticarillina / Acido clavulanico	≥ 15	-	≤ 14
Piperacillina	≥ 18	-	≤ 17
Gentamicina	≥ 15	13-14	≤ 12
Tobramicina	≥ 15	13-14	≤ 12
Amikacina	≥ 17	15-16	≤ 14
Colistina	≥ 11	-	≤ 10

Standards di riferimento degli aloni di inibizione (mm) per *Pseudomonas aeruginosa*

### ***B. cepacia* complex**

- disco diffusione
- brodo diluizione
- agar diluizione
- E-test

Lettura della sensibilità dopo 20-24 ore a 35 ± 2°C in ambiente aerobio.



Per **disco diffusione** esistono i valori di riferimento solo per :

	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Ceftazidime	≥ 21	18-20	≤ 17
Meropenem	≥ 20	16-19	≤ 15
Minociclina	≥ 19	15-18	≤ 14
Trimetoprim/sulfametossazolo	≥ 16	11-15	≤ 10

Standards di riferimento degli aloni di inibizione (mm) per *Burkholderia cepacia complex*

Utilizzando sistema **E-test** e **metodi in diluizione** è possibile saggiare i seguenti antibiotici:

	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16
Minociclina	≤ 4	8	≥ 16
Trimetoprim/sulfametossazolo	≥ 2/38	-	≤ 4/76
Ticarcillina / Acido Clavulanico	≤ 16/2	32/2-64/2	≥ 128/2
Levofloxacina	≤ 2	4	≥ 8
Cloramfenicolo	≤ 8	16	≥ 32

Standards di riferimento delle MIC (µg/L) per *Burkholderia cepacia complex*

### *S. maltophilia*

- disco diffusione
- brodo diluizione
- agar diluizione
- E-test

Lettura della sensibilità dopo 20-24 ore a 35± 2°C in ambiente aerobio.

Per **disco diffusione** esistono i valori di riferimento solo per 3 molecole antibiotiche:

	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Minociclina	≥ 19	15-18	≤ 14
Levofloxacina	≥ 17	14-16	≤ 13
Trimetoprim/sulfametossazol o	≥ 16	11-15	≤ 10

Standards di riferimento degli aloni di inibizione (mm) per *Stenotrophomonas maltophilia*

Utilizzando il sistema **E-test** e **metodi in diluizione** è possibile saggiare:

	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>R</b>
Minociclina	≤ 4	8	≥ 16
Levofloxacina	≤ 2	4	≥ 8
Trimetoprim/sulfametossazolo	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ticarcillina / Acido clavulanico	≤ 16/2	32/2-64/2	≥ 128/2
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32
Cloramfenicolo	≤ 8	16	≥ 32

Standards di riferimento delle MIC (µg/L) per *Stenotrophomonas maltophilia*





### *A. xylosoxidans*

I criteri di interpretazione disponibili fanno riferimento ai seguenti metodi:

- brodo diluizione
- agar diluizione
- E-test

Lettura della sensibilità dopo 16-20 ore a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  in ambiente aerobio

Utilizzando il sistema E-test e metodi in diluizione è possibile saggiare:

	S	I	R
Piperacillina	$\leq 16$	32-64	$\geq 128$
Piperacillina-tazobactam	$\leq 16/4$	32/4-64/4	$\geq 128/4$
Ticaracillina / Acido clavulanico	$\leq 16/2$	32/2-64/2	$\geq 128/2$
Ceftazidime	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Cefepime	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Aztreonam	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Imipenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Meropenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Colistina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Tobramicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Amikacina	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Levofloxacina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Cloramfenicolo	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Trimetoprim/sulfametossazolo	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$

Standards di riferimento delle MIC ( $\mu\text{g/L}$ ) per *Achromobacter xylosoxidans*.

### *Mycobacterium abscessus* e *Mycobacterium chelonae*

Non abbiamo per ora metodi standardizzati e universalmente riconosciuti per la valutazione in vitro della sensibilità agli antibiotici di *M. chelonae* e *M. abscessus*. Esistono delle raccomandazioni CLSI (30) secondo cui la tecnica da utilizzare è la microdiluizione in brodo. In commercio esistono pannelli per l'esecuzione della microdiluizione in brodo, il Sistema Sensititre della Ditta TREK Diagnostic Systems, distribuito in Italia dalla Ditta DID.

Per la semplicità di esecuzione, E-test può costituire una pratica alternativa alla microdiluizione in brodo anche se alcuni autori hanno dimostrato una sovrastima di resistenza verso alcuni antibiotici (32).

Utilizzando sistema E-test e metodi in diluizione è possibile saggiare i seguenti antibiotici:

	S	I	R
Amikacina	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Azitromicina	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$
Tigecyclina	$\leq 4$	-	-
Levofloxacina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Claritromicina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Imipenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Trimetoprim/sulfamet.	$\leq 2/32$	-	$\geq 4/64$
Cefoxitina	$\leq 16$	32-64	$\geq 128$
Linezolid	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Tobramicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$



### **Microdiluzione in brodo (secondo metodo CLSI)**

- Medium: MHA + cationi
- Inoculum: Allestire una sospensione batterica di torbidità pari allo 0,5 McFarland,
- Temperatura e atmosfera di incubazione: 30°C in ambiente aerobio
- Tempo di incubazione: 72 ore fino ad un massimo di 5 gg

### **Sistema Epsilometer Test (E – test) secondo indicazioni della Ditta produttrice**

- Medium: MHA arricchito con 5% di sangue di montone
- Inoculum: Allestire una sospensione batterica di torbidità pari allo 0,5 McFarland, dopo aver eseguito almeno due subculture)
- Temperatura e atmosfera di incubazione: 35°C in ambiente aerobio
- Tempo di incubazione: 72 ore

In letteratura esistono studi che indicano delle varianti al test sopra descritto che sono (32):

- utilizzo di MHA arricchito con OADC
- Inoculo a partire da una sospensione di torbidità 1 McFarland
- Incubazione a 30°C in ambiente aerobio

## **TEST DI ASSOCIAZIONI FRA FARMACI**

Sui ceppi multi resistenti agli antibiotici, al fine di evidenziare “in vitro” il possibile effetto di combinazioni di antibiotici (sinergismo, antagonismo o indifferenza), si consiglia di utilizzare come test di associazioni di farmaci: agar diffusione, time-killing, checkerboard o E test.

L'E test è la metodica di più semplice esecuzione e facilmente realizzabile nel laboratorio di microbiologia clinica (33).

Come indicato dal “Centro di Riferimento per i Test di Sinergia” della CF Foundation (USA) (<http://synergy.columbia.edu/>), i test di associazioni di farmaci devono essere eseguiti per non più di due volte l'anno su ceppi di *P.aeruginosa* multiresistenti isolati da pazienti FC con almeno una delle seguenti caratteristiche:

- Pazienti con FEV<sub>1</sub> < 40%
- Pazienti pre-trapianto polmonare
- Pazienti post trapianto polmonare
- Pazienti con allergie significative ai farmaci
- Pazienti in cui vi è stato un evidente fallimento dei trattamenti antibiotici convenzionali.

**NB. Si definiscono ceppi multiresistenti (secondo la definizione della Cystic Fibrosis Foundation americana): se presentano resistenza a tutti gli agenti di almeno due delle seguenti classi: β-lattamici (includendo imipenem, meropenem ed aztreonam), chinolonici e aminoglicosidi**



**Le associazioni indicativamente da eseguire su *P. aeruginosa*:**

piperacillina+tobramicina	ticarcillina/clav+tobramicina	imipenem+ciprofloxacina
tobramicina+meropenem	tobramicina+imipenem	ceftazidime+amikacina
tobramicina+cefazidime	aztreonam+tobramicina	meropenem+ciprofloxacina
meropenem + amikacina	piperacillina + ciprofloxacina	cefepime + tobramicina

Le associazioni sopra riportate sono suggerite dalla CF Foundation americana; in Italia può essere utile testare anche la colistina e la levofloxacina. spesso utilizzate dal clinico per la terapia anti *P. aeruginosa*.

Per gli altri gram-negativi non fermentanti (*B.cepacia*-complex, *S.maltophilia* e *A.xylosoxidans*) non ci sono indicazioni concordi sull'utilità di eseguire i test di associazione e la loro standardizzazione (34).

Nel caso si debbano eseguire, in casi selezionati di pazienti critici, alcuni autori consigliano le seguenti associazioni:

***B.cepacia* complex e *A. xylosoxidans***

meropenem+doxiciolina	ciprofloxacina+meropenem	meropenem+cotrimossazolo
ciprofloxacina+piperacillina	doxiciolina+cloramfenicolo	cloramfenicolo+ceftazidime
doxiciolina+imipenem	ciprofloxacina+cloramfenicolo	cefepime+cloramfenicolo
tobramicina+meropenem	imipenem+ceftazidime	meropenem+cloramfenicolo

***S.maltophilia***

doxiciolina+ticarcillina/clav.	doxiciolina+ciprofloxacina	aztreonam+ticarcillina/clav
cotrimossazolo+doxiciolina	doxiciolina+piperacillina/taz	ciprofloxacina+ticarcillina/clav.
cotrimossazolo+piperacillina/taz.	cotrimossazolo+ticarcillina/clav.	ciprofloxacina+piperacillina/taz.

Le associazioni sopra riportate sono riferite dalla CF Foundation americana, in Italia si ricorda che spesso il clinico per la terapia anti *P. aeruginosa* usa colistina invece di tobramicina e levofloxacina invece di ciprofloxacina



## SCHEMA RIASSUNTIVO

**Raccolta dei campioni:** sono particolarmente indicati il tampone faringeo, l'aspirato ipofaringeo e l'escreato.

**Conservazione:** è concessa la conservazione a 4 °C; è opportuno segnalare le limitazioni di esami eseguiti su campioni ricevuti per posta.

**Periodicità:** esami con cadenza trimestrale o al momento della riacutizzazione.

**Trattamento dell'escreato:** è necessaria la fluidificazione da eseguirsi meccanicamente tramite omogenizzatori o con mucolitici quali il ditiotreitolo.

**Osservazione microscopica:** è ritenuta non indispensabile.

**Carica batterica:** è sufficiente ma indispensabile l'indicazione semiquantitativa della carica; se la carica batterica è elevata per l'isolamento di alcuni batteri si consiglia la diluizione del campione.

**Terreni di coltura:** si consiglia l'uso obbligatorio dei seguenti terreni: agar MacConkey, agar cioccolato con bacitracina, agar sale mannite, agar sangue, agar BCSA, agar Sabouraud addizionato di antibiotici (cloramfenicolo e gentamicina) e opzionale dei seguenti: agar ceftrimide. Per i miceti, 48 ore a 35-37°C e dopo fino a 3 settimane a temperatura ambiente.

**Incubazione:** per 2 giorni a 35-37 °C; è necessario prolungare di altre 24 ore l'incubazione dei terreni idonei alla crescita dei Gram-negativi non fermentanti. Nel caso specifico di *B. cepacia*-complex l'incubazione si può protrarre temperatura ambiente per una settimana.

**Microrganismi da segnalare:** è importante segnalare tutti i microrganismi potenzialmente patogeni per pazienti FC; la segnalazione di microrganismi che rientrano nella definizione di "normale flora" è da effettuarsi a discrezione del microbiologo o su specifiche indicazione cliniche.

**Anaerobi:** devono essere ricercati su specifica richiesta del clinico e solo su campioni idonei.

***S. aureus*:** la meticillino-resistenza deve essere testata su tutti i ceppi di *S. aureus* isolati rispettando le indicazioni del CLSI. Si consiglia di eseguire un test di screening per la resistenza ai glicopeptidi su tutti i ceppi di *S. aureus*.

***S. aureus* "Small Colony Variant" (SCVs):** per il loro isolamento ottimale si richiede l'incubazione dei terreni specifici per almeno 72 ore.

E' necessario eseguire l'antibiogramma con Mueller-Hinton Agar con il 5% di sangue.

La valutazione della meticillino-resistenza deve essere effettuata testando la sensibilità alla cefoxitina (con dischetto da 30 µg su Agar Sangue Columbia) e/o seminando le colonie sospette su un terreno cromogeno specifico per MRSA, che supporta anche la crescita di SCVs.

***S. pneumoniae*:** è necessario testare la resistenza alla penicillina G da eseguirsi in agar diffusione su Mueller Hinton supplementato con sangue di montone al 5% con un dischetto di oxacillina da 1 µg. Nel caso di resistenza per la penicillina e il ceftriaxone confermare con E-test.

**Gram-negativi non-fermentanti:** identificazione: può essere eseguita su tutti gli isolati e tutti i fenotipi con metodiche manuali e sono consigliate in particolare le gallerie API (Biomérieux), le metodiche automatizzate devono essere utilizzate per i fenotipi non difficili. Per quanto riguarda l'identificazione di *B. cepacia* è consigliabile ripeterla utilizzando due metodi diversi ed eventualmente eseguire tests biochimici supplementari.

**Valutazione della chemiosensibilità:** deve essere testata secondo le raccomandazioni CLSI 2009 è importante differenziare almeno i morfotipi "non-mucoide" e "mucoide" e "SCV" di *P. aeruginosa* e testarne la chemiosensibilità separatamente preferibilmente utilizzando la metodica in agar (disco diffusione o Etest) ricordando che i sistemi automatizzati possono dare risultati poco attendibili. Per *P. aeruginosa*, *A. xylooxidans*, *S. maltophilia* e *B. cepacia* complex si consiglia di testare la chemiosensibilità dei seguenti farmaci: netilmicina, tobramicina, gentamicina, amikacina, imipenem, piperacillina, piperacillina/tazobactam, ticarcillina/clavulanato, ceftazidime, aztreonam,



cefepime, meropenem, ciprofloxacina, levofloxacina e cotrimossazolo, colistina. Su ceppi multiresistenti (resistenti a tutti gli agenti di almeno due delle seguenti classi:  $\beta$ -lattamici, aminoglicosidi, chinolonici), si consiglia di testare anche: meropenem, piperacillina/tazobactam, tetraciclina/cloramfenicolo. Su tali ceppi deve essere valutata anche l'eventuale sinergia fra associazioni di farmaci.

Per *Mycobacterium abscessus* si consiglia di testare claritromicina o azitromicina, amikacina e cefoxitina.

Per *Mycobacterium chelonae* non esiste una terapia ottimale si consiglia di testare tobramicina, claritromicina o amikacina (24).

**Tipizzazione intraspecifica:** è utile per studi di tipo epidemiologico, a causa della notevole variabilità fenotipica di *P. aeruginosa*, *B. cepacia*-complex e *S. aureus* è necessario basarsi su una tipizzazione genetica intraspecifica (DNA fingerprints).

***Mycobacteria* spp:** Devono essere ricercati su specifica richiesta del clinico presso un Servizio di micobatteriologia di livello 2 o Regionale. L'esame batterioscopico può essere eseguito con colorazione di Kinyoun o con colorazione fluorocromica e ad esso deve sempre seguire l'esame colturale. È opportuno segnalare che il materiale proviene da pz portatore di FC in modo che il laboratorio proceda a doppia decontaminazione con acido ossalico.

***M. abscessus* e *M. chelonae*:** per il loro isolamento si richiede l'incubazione del terreno selettivo per *B. cepacia* complex il BCSA per almeno 5 – 15 gg dalla semina.

Questo terreno, facilita l'individuazione di questi due microrganismi che si manifestano con colonie lisce o mucose dal tipico odore di cantina.

**Miceti:** Utilizzare sempre agar Sabouraud addizionato di antibiotici come terreno routinario per la ricerca dei funghi filamentosi e dei lieviti. Per un'identificazione corretta a livello di specie dei funghi filamentosi eseguire sub-colture su medium minimali quali il Potato Dextrose Agar o sul terreno Sabouraud-cloramfenicolo, incubando per una-due settimane ed successivamente effettuando l'osservazione macroscopica e microscopica delle colonie fungine. Se necessario eseguire sub-colture su vetrino in terreno stimolante la formazione dei conidi, come il Potato Dextrose Agar.



### Bibliografia

1. **Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD.** Cystic Fibrosis Microbiology. Cumitech 43. 2006; ed. ASM Press, Washington, D.C.
2. **Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Host B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JRW.** Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. In J Syst Bacteriol 1997; 47: 1188-1200.
3. **Solè A, Salavert M** Fungal infections after lung transplantation. Transplantation, 2008, 22: 89-104.
4. **Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara JP.** Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis- a review. Med Mycol 2009; 47: 387-397.
5. **Horrè R, Schaal KP, Siekmeirer R, Sterzik B, de Hoog GS, Schnitzler N.** Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from cystic fibrosis. Respiration. 2004; 71:360-366
6. **Roux AL, Catherinot E, Ripoll F, Gaillard JL.** Multicenter Study of Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Patients with Cystic Fibrosis in France J Clin Microbiol 2009; 47: 4124 – 28.
7. **Sanguinetti M, F. Ardito, E. Fiscarelli, M. La Sorda.** Fatal pulmonary infection due to multidrug – resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. 2001; 39: 816- 819
8. **Zaidi S, Heinle J.S, Mallory G.B.** Mycobacterium abscessus in cystic fibrosis lung transplant recipients: report of 2 cases and risk for recurrence. Trasplant infectious Disease. ISSN 2009; 1398-2273.
9. **Griffith D.E, Aksamit T, Catanzaro A, Daley C, Winthrop K.** An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Med.2007; 175: 367-416.
10. **Gilligan P.H.** Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol. Rev.1991; 4(1): 35-51.
11. **Ramsey B. W, Wentz K. R., Smith A. L., Richardson M., Williams-Warren J., Hedges D. L., Gibson R., Redding G. J., Lent K. and Harris K.** Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. Am. Rev. Respir. Dis. 1991; 144: 331-337.
12. **Sadeghi E., Matlov A., Mac Lusky I., and Karmali A.** Utility of gram stain in evaluation of sputa from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 1994; 32(1): 54-58.



13. **Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, Roe MH, Vandamme P, Speert D.** Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory secretion of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1004-1007.
14. **Clinical and Laboratory Standards Institute,** 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19<sup>th</sup> informational supplement M100-S19, vol 29, no3. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
15. **Christoff von Eiff .** *Staphylococcus aureus* small colony variant: a challenge to microbiologists and clinicians. *Int J Antimicrob.* 2008; 31:507-510.
16. **Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K, Govan JR.** Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. *Int J Syst bacterial.* 1997; 47: 1188-1200.
17. **Mahenthiralingam E, Bischof J, Byrne K, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, Vandamme P.** DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovar I and III. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3165-3173.
18. **Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM, Honeybourne D, Maiden MCJ, Govan KR, Speert DP, LiPuma JJ, Vandamme P, Dowson CG.** Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4665-73.
19. **Anderson S. W., Jennifer R. Stapp, Burns J.L., and Qin X.** Characterization of Small-Colony- Variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 529-535.
20. **Tortoli E, Piersimoni C, Scarparo C, Cirillo D.M.** *Micobatteriologia Clinica AMCLI* 2009, ed. Selecta Medica
21. **Cernoch P.L., Enns R.K., Saubolle M.A., Wallace R.J.Jr.** Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Cumitech 16A, 1994 ed. Weissfeld A.S., Washington D.C.
22. **Whittier S., Hopper R. L, Knowles M.R. , Gilligan P. H.** Improved recovery of Mycobacteria from respiratory secretion of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.*1993; 31(4):861-864
23. **Clinical and Laboratory Standards Institute,** 2007. Laboratory detection and identification of mycobacteria; proposed guideline. C.L.S.I. 2007, Forbes, BA
24. **Russo C, Tortoli E, Menichella D.** Evaluation of the new GenoType *Mycobacterium* assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 334-339.



25. **Roman F, Canton R, Perez-Vasquez M, Baquero F and Campos J.** Dynamic of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2007-2014.
26. **Bilton D, Pye A, Johnson MM, Mitchell LJ, Dodd M, Webb AK, Stockley RA and Hill SL.** The isolation and characterization of non-typeable *Haemophilus influenzae* from the sputum of adult cystic fibrosis patients. *Eur Respir J.* 1995; 8: 948-953.
27. **Del Campo R, Morosini MI, de la Pedrosa EG, Fenoll A, Munoz-Almagro C, Maiz L, Baquero F, Canton R, and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network.** Population Structure, antimicrobial resistance and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1450-1459.
28. **Morris AJ, Byrne TC, Madden JF, Reller LB.** Duration of incubation of fungal cultures *J Clin Microbiol.* 1996; 34:1583-1586.
29. **Labarca JA, Wagar EA, Grasmick AE, Kokkinos HM, Bruckner DA.** Critical evaluation of 4-week incubation for fungal cultures: is the fourth week useful? *J Clin Microbiol.* 1998; 36:3683-3685.
30. **NCCLS 2003.** Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes; approved standard M24-A: Vol 23, no18 Replaces M24-T2 Vol.20 N°26 Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
31. **Saiman L and Siegel J.** Infection and control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission . *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003; 24: S6-S52.
32. **Woods Gail L, Bergmann John S, Wanger Audrey.** Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae and Mycobacterium fortuitum. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 656-661.
33. **Manno G, Ugolotti E, Belli MM, Feni ML, Romano L, Cruciani M.** Use of the E-test to asses synergy of antibiotic combinations against isolates of *Burkholderia cepacia* complex from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 28-34.
34. **George AM, Jones PM, Middleton PG.** Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 300:153-64.

