L'appropriatezza in microbiologia : la patologia respiratoria

M. Schinella[a], I. Bianco[b]

[a]Laboratorio di chimica clinica e microbiologia, Ospedale di Rovereto
[b]Servizio di Patologia Clinica, Ospedale di Lanciano

Gruppo di Studio sulle Malattie Infettive
Coordinatore: *M. Schinella*
Vice-Coordinatore: *A. Camporese*
Membri: *G. Bertiato, G. Casiraghi, M. Libergoli, G. Pigoli, M. Pradella, M. Ruscio*

Le infezioni delle vie respiratorie rappresentano la patologia infettiva di più frequente riscontro in ambiente comunitario: quaranta milioni di visite per faringiti e dieci milioni di visite seguite da più di 600.000 ricoveri per polmoniti sono state calcolate annualmente solo negli Stati Uniti. Rappresentano, da sole, la seconda causa di infezione nosocomiale e la loro elevata incidenza e prevalenza hanno una notevole ricaduta sul laboratorio di microbiologia in termini di richiesta d'esami diagnostici, nell'intento di identificare l'agente patogeno responsabile dell'infezione e di scegliere la terapia più idonea.
L'appropriatezza della richiesta e dell'esecuzione dei test, in rapporto alle diverse patologie respiratorie, rappresenta una condizione essenziale per la razionalizzazione e il buon uso delle indagini microbiologiche sulla base delle evidenze scientifiche. Una richiesta mirata permette un migliore e più efficace approccio diagnostico, riduce il numero degli esami inappropriati ed inutili per il paziente e permette di arrivare in tempi brevi alla giusta terapia.
Le infezioni delle vie respiratorie sono molteplici; la nostra scelta è stata quella di occuparci di quelle più rappresentative delle alte e basse vie respiratorie, oggetto di buona parte delle richieste d'indagini microbiologiche.
Per infezioni delle alte vie respiratorie si intende uno stato morboso sostenuto generalmente da una specie batterica patogena predominante sulla flora commensale delle vie aeree, la cui patogenesi è sostenuta attraverso vari meccanismi (produzione di tossine, adesività alle mucose, superamento delle barriere epiteliali, etc.) in soggetti recettivi, che possono presentare fattori di rischio quali: età avanzata, malattie intercorrenti, terapie immunosoppressive.
Le infezioni, in base alla sede, possono essere classificate in: laringite, epiglottidite, faringotonsillite, rinosinusite, otite media acuta.
La patologia più importante, a livello delle alte vie respiratorie, è rappresentata dalla faringite acuta batterica o faringo-tonsillite sostenuta da Streptococco β -emolitico di gruppo A, per la quale è chiaramente indicata una terapia antimicrobica, tenendo conto delle possibili complicazioni a distanza (malattia reumatica). La diagnosi di angina da *S. pyogenes* è difficile solo sulla base della sintomatologia, ricorrendo la stessa in molte altre situazioni infettive soprattutto di origine virale. La faringo-tonsillite streptococcica è appannaggio prevalentemente dell'età pediatrica, in inverno o in primavera, con esordio febbrile improvviso.
La diagnosi di laboratorio della faringite streptococcica può essere eseguita con tre differenti metodi:

– La coltura. L'isolamento dello *S. Pyogenes* è possibile raccogliendo l'essudato mediante tampone, seminandolo su appositi terreni.
– Il test rapido per la determinazione dell'antigene streptococcico. Da un'analisi dei risultati relativi ai diversi metodi utilizzati (latex agglutination, enzyme-linked immunosorben assay, ottical immunoassay) confrontati con i tradizionali metodi colturali, 12 studi hanno dimostrato una specificità > 97% e una sensibilità che varia tra dal 62% al 96%, secondo gli studi. A causa della sua scarsa sensibilità l'American Heart Association raccomanda che tutti i risultati negativi siano confermati dalla coltura. A questo problema si aggiunge molto spesso che negli ambulatori medici, dove questo test trova grande applicazione, non vengono eseguiti in modo continuo i controlli di qualità necessari a garantire il risultato.
– Tecniche di DNA-probes. In commercio sono disponibili 2 test che utilizzano tecniche molecolari: il Gen Probe Group A Strep Direct Test e il

Corrispondenza a: Dott. Michele Schinella, Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale Santa Maria del Carmine, Piazzale Santa Maria, 6 -38068 Rovereto. Tel. 0464.453219 email:schinella@rov.apss.tn.it

LightCycler Strep-A. Entrambi permettono l'identificazione diretta degli streptococchi da campioni faringei Si tratta di test caratterizzati da sensibilità superiore al 90%, ma ancora di scarsa diffusione

Mentre gli Streptococchi β -emolitici di gruppo A (a differenza dei gruppi B e F) sono riconosciuti come causa di faringiti, restano controversi i gruppi C e G. Recentemente alcuni studi hanno dimostrato una associazione tra faringite e un tipo di colonie larghe di streptococchi C, classificate come *Streptococcus dysagalactiae subsp. equisimilis*.

Per il prelievo devono essere utilizzati unicamente tamponi in dacron, in quanto i tamponi in cotone possono inibire lo sviluppo di talune specie batteriche mentre i tamponi di alginato di calcio possono interferire nella ricerca degli agenti patogeni con metodiche di biologia molecolare.

È opportuno ricordare che l'esecuzione dei tamponi faringei e/o dei test rapidi, dovrebbero essere eseguiti esclusivamente quando si sospetta una faringite streptococcica per poter differenziare uno stato di portatore cronico da un caso di faringite acuta streptococcica. Non va eseguito in caso di un sospetto di epiglottidite acuta, perché si può indurre una grave ostruzione delle vie aeree superiori e la diagnosi è esclusivamente clinica.

E' sostenuto, in maniera autorevole e da più parti, che in caso di richiesta di tampone faringeo per Streptococco β -emolitico il laboratorio di microbiologia deve indicare solo la positività del germe e non fornire antibiogramma. La terapia elettiva è, infatti, quella con penicillina per l'assenza di resistenza da parte del germe, ma sempre più spesso questa patologia viene trattata con macrolidi verso i quali si è assistito al progressivo insorgere di resistenza.

Vale la pena di ricordare le faringiti sostenute da *Chamydia pneumoniae e Mycoplasma pneumoniae*, conosciuti come responsabili principalmente di infezioni delle basse vie respiratorie ma recentemente chiamati in causa, forse grazie ad una migliore diagnostica, anche di infezioni delle prime vie.

La polmonite rappresenta un'entità clinica di notevole impatto sia in termini di mortalità – la più comune causa di morte per infezione – che per l'impegno diagnostico necessario (agenti eziologici non riconosciuti in una buona metà dei casi).

La polmonite viene definita come una infezione acuta del parenchima polmonare, con immagine radiologica di addensamento segmentario o multiplo non preesistente né riferibile ad altre cause, che compare entro 72 ore dall'esordio clinico dei sintomi (*British Thoracic Society)*.

Se l'intervento del laboratorio di microbiologia è alquanto discusso nella diagnosi di polmonite comunitaria in paziente domiciliare, più decisivo è il suo apporto diagnostico nel definire l'eziologia della polmonite nel paziente ospedalizzato. Accanto alla diagnosi eziologica di polmonite con l'isolamento del microrganismo infettante, l'American Thoracic Society (ATS) e l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) danno grande importanza ai dati epidemiologici (età, storia familiare, viaggi, recenti ospedalizzazioni, terapie antecedenti, polipatologie, ecc.) per poter arrivare ad una diagnosi certa ed ad una valutazione della gravità della malattia con conseguente scelta terapeutica.

Ai fini di un corretto inquadramento diagnostico, vanno distinte le polmoniti acquisite in comunità, riscontrate in pazienti non ospedalizzati e con anamnesi negativa per ricoveri nelle 48-72 ore precedenti i sintomi o ospiti di residenze assistite nei 14 giorni precedenti, dalle polmoniti nosocomiali non presenti, né in incubazione al momento del ricovero e con sintomi manifesti 72 ore dopo il ricovero.

Questa distinzione si collega, infatti, ad eziologie diverse che caratterizzano insieme all'età alle condizioni immunitarie e a patologie concomitanti la polmonite comunitaria da quella nosocomiale.

La polmonite comunitaria non è un'entità omogenea e anche se in una serie rilevante di casi l'agente eziologico non viene riconosciuto è sostenuta principalmente da *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila* e Virus respiratori.

Lo *Streptococcus pneumoniae* rappresenta l'agente più comunemente coinvolto nelle polmoniti acquisite in comunità, batterio storicamente sensibile alla penicillina, chemioterapico di elezione. Nel corso degli anni si è assistito da parte di questo germe ad un preoccupante aumento delle resistenze nei confronti di penicilline e cefalosporine ma anche verso antibiotici non beta-lattamici, compresi i macrolidi. Analoga situazione si è verificata da parte di *H. influenzae* che ha mostrato un aumento delle resistenze nei confronti dell' ampicillina.

Una tempestiva rilevazione di fenotipi di resistenza, clinicamente importanti, da parte di un osservatorio privilegiato quale il laboratorio di microbiologia, che riconosce in questa sorveglianza uno dei suoi più importanti compiti, contribuisce ad instaurare la giusta terapia in una patologia dagli esiti ancora molto spesso fatali. La polmonite nosocomiale rappresenta la seconda infezione tra le nosocomiali e l'83% delle polmoniti che si hanno in unità di terapia intensiva a causa della ventilazione di tipo meccanico che ne rappresenta il maggior fattore di rischio. Lo Stafilococco aureo e i germi aerobi Gram-negativi molto spesso multi-resistenti sono tra i più comuni agenti eziologici.

La conoscenza dell'epidemiologia locale, frutto del lavoro di sorveglianza e monitoraggio svolti dalla microbiologia, costituiscono un valido supporto per instaurare una terapia empirica in attesa dei dati definitivi.

Sia l'ATS che l'IDSA raccomandano che sia eseguita una radiografia del torace ogniqualvolta si sospet-

ti una polmonite, anche se raramente è possibile giungere ad una diagnosi eziologica con il suo solo aiuto.
Tutte le principali linee-guida, con qualità dell'evidenza e livelli di raccomandazione comparabili, sono concordi sull'esecuzione di test diagnostici microbiologici per l'identificazione dell'agente eziologico nel paziente che si ricovera per polmonite.
Le indagini devono comprendere, prima del trattamento antibiotico, due emocolture ed un esame colturale semiquantitativo con esame microscopico dell'espettorato, verificato nella sua idoneità secondi i criteri di Bartlett.
L'idoneità del campione, che testimonia la sua appartenenza alle basse vie respiratorie, è di grande importanza in questa diagnostica e si basa sul numero dei granulociti e delle cellule epiteliali squamose presenti all'osservazione microscopica; alcuni autori fondano il loro giudizio sul numero assoluto, altri sul rapporto. La presenza, comunque, di molte cellule epiteliali e di pochi o assenti polimorfonucleati è indicativa di una raccolta non idonea e il campione, non rappresentativo delle basse vie aeree, deve essere rifiutato; in caso contrario con l'esame microscopico è bene fornire un referto commentato, con il tipo di batterio predominante, indicazione di estrema utilità per il clinico per instaurare una terapia.
Lo screening di idoneità non va eseguito su campioni ottenuti da pazienti per sospetta infezione da Legionella o da *Micobacterium tubercolosis* e non va rifiutato quando si tratta di pazienti immunodepressi o in casi in cui è difficile ottenere un altro campione. E' da rilevare che il prelievo dell'espettorato non eseguito correttamente influenza in maniera negativa la sensibilità e la specificità di un esame non invasivo e così importante per la diagnosi di polmonite.
E' necessario porre molta attenzione nell'interpretazione dell'esame microscopico, con colorazione di Gram, giacché sia la somministrazione di antibiotici che l'ospedalizzazione possono mostrare al microscopio microrganismi non più vitali per la terapia o modificare l'eco sistema, inducendo ad esempio un aumento degli aerobi Gram negativi. E' stata inoltre dimostrata una notevole variabilità intra laboratorio nell'interpretazione dello striscio; in un recente studio la sensibilità e la specificità della colorazione di Gram di campioni idonei per le diagnosi di polmonite da *S. pneumoniae o da H. Influenzae* variavano dal 52% al 82% ed al 97% al 99%, rispettivamente.
Tutti questi fattori influiscono sulla sensibilità e la specificità delle colture dell'espettorato rendendo indispensabile l'interpretazione dei risultati in funzione delle notizie cliniche. Numerose altre tecniche di prelievo, riservate a pazienti selezionati, sono state messe a punto per ottenere campioni sicuramente provenienti dalle basse vie respiratorie con l'ausilio del broncoscopio tra cui: il lavaggio bronchioalveolare (BAL), l'aspirato bronchiale, il lavaggio bronchiale, lo spazzolamento (brushing) endo-bronchiale e l'aspirato transtracheale. La determinazione quantitativa della carica batterica nei materiali delle basse vie respiratorie, raccolti con metodiche protette, è molto importante per il riconoscimento di un valore soglia indicativo di infezione.
Sul ricorso a queste modalità di prelievo non ci sono indicazioni univoche ma un dato importante che emerge dall'analisi delle polmoniti è che la maggior parte dei pazienti viene trattata con successo senza ricorrere a queste tecniche invasive.
Test diagnostici rapidi poco costosi e di notevole aiuto per il clinico possono comprendere la ricerca diretta su urine di antigeni di *Streptococcus pneumoniae* e di *Legionella pneumophila* sempre associati ai metodi standard di diagnosi.
Le indagini volte ad accertare l'eziologia virale, con tecniche immunoenzimatiche dirette o molecolari, non possono prescindere da criteri legati all'età (virus respiratorio sinciziale- metapneumovirus in età pediatrica) alla stagionalità (virus influenzali) e a quelli legati all'epidemiologia (virus SARS)
Il campione di scelta per la ricerca di virus respiratori, responsabili di infezioni delle basse vie, è rappresentato dall'aspirato naso-faringeo e/o dal tampone naso-faringeo. Questo prelievo è di facile esecuzione, non invasivo, usato soprattutto in età pediatrica per la difficoltà di ottenere i classici materiali respiratori; con questo tipo di prelievo, largamente utilizzato e raccomandato nella recente epidemia di SARS, si può rilevare la presenza di numerosi virus, responsabili di polmoniti, in ogni momento della virosi ma sicuramente di grande utilità nella fase iniziale dell'infezione.
Non si sono rivelate utili, se non a scopo epidemiologico, le indagini sierologiche per la presenza di anticorpi verso gli agenti più comuni di polmoniti.
Nell'intento di determinare in modo rapido ed accurato i patogeni responsabili di infezioni delle basse vie respiratorie difficili da coltivare, di aumentare sensibilità e specificità sono stati sviluppati test molecolari con la possibilità di fare anche diagnosi contemporanea di più agenti tra quelli più rappresentativi, causa di infezioni respiratorie.
Accanto alle tecniche tradizionali di *Polimerase Chain Reaction* (PCR e PCR-nested) il nuovo approccio diagnostico molecolare tende a fornire risultati quantitativi con notevole riduzione dei tempi (Real-time Pcr, Biochip) con possibilità di diagnosi di agenti virali attualmente difficili da individuare (Influenza, Parainfluenza, Respiratorio-sinciziale, SARS- CoV)
Il loro utilizzo nella diagnostica routinaria non è ancora molto diffuso, anche se vi sono buone premesse perché diventino un ausilio importante per dirimere situazioni cliniche difficili, a patto di essere gestiti con professionalità e in stretta collaborazione tra il clinico e il microbiologo.

Questa successione di indagini riflette la complessa e diversa eziologia delle polmoniti e conferma, se ancora necessario, la necessità della gestione da parte del microbiologo degli esami da eseguire per arrivare ad un collegamento tra il risultato delle ricerche e l'agente responsabile del quadro clinico del paziente.

In conclusione l'appropriatezza nella richiesta e nell'esecuzione degli esami microbiologici per la diagnosi eziologica delle infezioni respiratorie rappresenta un cardine per la corretta gestione di questo difficile percorso diagnostico, un percorso che deve essere qualitativamente validato e controllato ai fini di aumentarne l'efficacia e di mantenere sempre un alto rapporto costo beneficio.

Bibliografia

1. Smellie WSA Appropriateness of test use in pathology: a new era or reinventing the wheel? Ann Clin Biochem 2003; 40:585-92.
2. Steinbach WJ, Shetty AK. Use of the diagnostic bacteriology laboratory: a practical review for the clinician. Postgrad Med J 2001; 77:148-56.
3. Guidelines for Prevention of Nosocomial Pneumonia MMWRhttp://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00045365. htm (data ultima consultazione 03/05/04).
4. Bourbeau PP. Role of the microbiology laboratory in diagnosis and management of pharyngitis. J Clin Microbiol 2003; 41:3467-72.
5. Carroll KC. Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections:controversy and conundrums. J Clin Microbiol 2002; 40:3115-20.
6. Cunha BA. Ambulatory community-acquired pneumonia: the predominance of atypical pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22:579-83.
7. File Jr TM. Community-acquired pneumonia. Lancet 2003; 362:1991-2001.
8. van Woensel JBM, van Aalderen WMC, Kimpen JLL. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. BMJ 2003; 327:36-40.
9. Hernrickson KJ. Parainfluenza viruses. Clinical Microbiology Reviews 2003; 16:242-64.
10. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2003; 4915-23.
11. Roson B, Fernandez-Sabe N, Carratala J, Verdaguer R, Dorca J, Manresa F *et al*. Contribution of a urinary antigen assay (Bimax NOW) to the early diagnosis of pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis 2004; 38:222-6.
12. Heikkinen T, Chonmaitre T. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. Clinical Microbiology Reviews 2003; 16:230-41.
13. Verduin, CM, Hol C, Fleer A, van Dijk H, van Belkum A. Moraxella catarrhalis: from emerging to established pathogen. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15:125-44.
14. Bartlett JG, Dowell SF, Mandelli LA, File Jr TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the mangements of community-acquired- pneumonia in adults. Clin Infect Dis 2000; 31:347-82.
15. J P.Lynch III, F J. Martinez. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Treatment in the New Century. http://www.medscape.com/viewprogram/690 (data ultima consultazione 03/05/04).
16. Mandell LA, Marrie TJ, Grossman RF, Chow AW, Hyland RH. Canadian guidelines for the initial management of community-acquired pneumonia: an evidence-based update by the Canadian Infectious Disease Society and the Canadian Thoracic Society. Clin Infect Dis 2000; 31:383-421.
17. American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. Am J Respir Crit Care Med 2001; 163:1730-54.
18. Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Whitney C; Infectious Diseases Society of America. Update of Practice Guidelines for the Mangement of Community-Acquired Pneumonia in Immunocompetent Adults. Clin Infect Dis 2003; 37:1405-33.