

Il campione per esame micologico: appropriatezza pre-analitica

***Marina Gaino **Giuseppe Tarabini Castellani**

*Laboratorio Microbiologia Ospedale S. Chiara Trento **Laboratorio Microbiologia Az. Osp. Pordenone

INTRODUZIONE

Per l'esame micologico sono applicabili gli stessi principi generali validi per le indagini batteriologiche (Tabella 1,2,3). In base alla localizzazione anatomica le micosi si distinguono in:

- Micosi superficiali e cutanee
- Micosi sottocutanee
- Micosi profonde

I campioni più idonei, a seconda del tipo di micosi e conseguentemente dell'agente responsabile, sono riportati in Tabella 4,5,6,7,8,9,10,11,12

La raccolta del campione deve essere fatta in modo asettico, detergendo dove possibile l'area con un disinfettante non fungicida, come alcool etilico 70% o se non possibile usare soluzione fisiologica, introducendo direttamente il grattato o i frammenti di tessuto in un contenitore sterile a bocca larga, tipo quello usato per la raccolta delle urine; e poiché la vitalità del campione diminuisce se la conservazione è troppo lunga, è bene che pervenga in laboratorio entro le 2 ore dal prelievo per l'opportuna semina.

Per il prelievo, in genere, è sconsigliato l'uso del tampone ad eccezione dei campioni ottenuti da aree "topograficamente difficili" come il condotto uditivo, il rinofaringe, l'orofaringe, vagina, cervice uterina. Da ricordare che campioni ottenuti da ferite aperte o da lesioni drenanti sono frequentemente contaminati da microrganismi ambientali.

Il trasporto del campione deve essere fatto in contenitori sterili, a prova di rottura e di perdita del contenuto, umidificati se necessario per evitare l'essiccamento; solo i campioni dermatologici (cute ed annessi) possono essere trasportati in contenitori asciutti. Sebbene i funghi possano essere recuperati in certe occasioni dai terreni di trasporto per anaerobi, il trasporto in terreno deve essere evitato.

L'intervallo tra prelievo e semina deve essere breve, nel caso dovessero ritardare più di qualche ora e bene conservare il campione a 4°C. Se il campione è sangue o Liquor (LCR), va invece conservato a 30-37°C, i campioni dermatologici vanno tenuti a 15-30°C. Alcune specie, come *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis* e *Aspergillus fumigatus* perdono vitalità se conservati a temperatura ambiente oltre le 3 ore o in ghiaccio secco. Per

Rhizopus arrhizus il ritardo nell'arrivo al laboratorio rende difficile l'isolamento.

Le procedure di prelievo e trasporto al laboratorio di ogni tipo di campioni devono essere condivise con il clinico ed il personale che esegue la raccolta deve essere istruito opportunamente. Così, se consideriamo un campione del tratto respiratorio inferiore come l'espettorato, sia esso prodotto spontaneamente od ottenuto a mezzo lavaggio tracheale, lavaggio bronchiale, oppure indotto, esso deve essere sempre fresco. Il paziente deve aver rimosso le protesi dentarie mobili e sciacquarsi bene la cavità orale con soluzione salina o con acqua bollita. L'espettorato deve essere il risultato di una tosse profonda oppure deve essere indotto da un aerosol salino (evitare gli espettorati salivari). Vanno raccolti 5-10 ml. in un contenitore sterile (sono molto comodi i vasetti a bocca larga a chiusura ermetica). Gli aspirati tracheali, i campioni broncoscopici e le biopsie polmonari vanno sempre inviati prontamente al laboratorio per essere trattati all'arrivo, in modo da evitare la diminuzione della vitalità dei miceti patogeni riscontrabili nelle secrezioni polmonari.

Se il campione è sangue, il prelievo eseguito come per emocoltura, va seminato direttamente nei flaconi in uso nel laboratorio. Un sistema ottimale per la semina diretta in piastra è Isolator Lysis centrifugation, nel quale 10 ml di sangue vengono raccolti direttamente nella provetta Isolator. Nel caso di midollo emopoietico, il prelievo (3-5-ml) va raccolto in SPS (Sodio Polianetol Solfato) o eparina. Si può utilizzare la provetta pediatrica di Isolator. La semina deve comunque essere fatta nei terreni da emocoltura per aerobi.

Il prelievo di pus, essudati e di drenaggi va eseguito con ago montato su siringa aspirando il materiale dall'ascesso ancora chiuso. Il materiale va quindi inserito in un contenitore sterile. Nel caso di ascessi miliari, questi vanno incisi con la lama di un bisturi ed il pus contenuto va raccolto in un contenitore sterile.

Il prelievo vaginale, ottenuto mediante tamponi sterili, va introdotto nella custodia del tampone e così inviato al laboratorio.

I tessuti, o di frammenti biotici, vanno raccolti asetticamente, partendo dal centro della lesione verso la periferia. Il tessuto va prelevato tra due foglietti di garza inumidita con alcune gocce di

soluzione fisiologica per evitare l'essiccamento, ed inviato, in contenitore sterile, rapidamente al laboratorio.

Se non si può trattare subito all'arrivo, va mantenuto refrigerato a +4°C fino ad un massimo di 8 ore. **FA ECCEZIONE IL CAMPIONE NEL QUALE SI SOSPETTANO ZIGOMICETI**, perché queste specie non tollerano la conservazione a temperature inferiore a +4°C.

Nel caso si sospetti una meningite fungina, il campione di liquor, il più abbondante possibile, va sempre raccolto in contenitore sterile, mantenuto e trasportato a +30-37°C fino al momento della semina. Il campione più appropriato per la diagnosi di infezione fungina dell'apparato urinario è quello ottenuto mediante cateterismo.

Se il campione non può essere prelevato mediante aspirazione o cistoscopia è considerata valida l'urina del primo mitto intermedio mattutino ottenuta sterilmente e che può essere conservata a +4°C per 12-14 ore.

Per altri fluidi corporei (sinoviale, pleurico, peritoneale), ricordare sempre che la raccolta deve essere ottenuta in maniera asettica in contenitore sterile ed inviata in breve tempo al laboratorio.

Campioni a contatto con l'esterno:

Se si tratta di capelli, non è necessario detergere il cuoio capelluto, il prelievo sarà eseguito strappando nell'area infetta i capelli con una pinza (almeno 10-12 capelli), nel caso che essi siano rotti e non possano essere strappati, saranno grattati, asportati con la lama di un bisturi.

Porre i capelli così ottenuti tra due vetrini portaoggetti o in un contenitore sterile etichettato con i dati del paziente.

Le unghie, vanno deterse con alcol etilico 70%. Per la campionatura della faccia dorsale, scarificare la superficie esterna ed eliminare il primo grattato, quindi continuare in profondità cercando di ottenere delle lamine sottili, e se possibile della polvere. Se si deve ottenere sostanza dalla parte inferiore dell'unghia, rimuovere con un bisturi i detriti non adesi, grattando successivamente in profondità.

È possibile raccogliere un grosso ritaglio dell'unghia o anche l'unghia intera.

Qualsiasi sia il campione ottenuto, va introdotto in un contenitore sterile, preferibilmente a bocca larga e a chiusura ermetica, da etichettare opportunamente.

La cute e gli spazi interdigitali, vanno detersi mediante strofinamento con della garza o con una spugnetta intrisa in soluzione fisiologica sterile o meglio alcool a 70°.

Scarificare tutta la lesione ed entrambi i lati dello spazio interdigitale con la lama del bisturi.

Se si sospetta una micosi corneale, lo scarificato

va immesso direttamente sul terreno di coltura a fianco del paziente, e successivamente portato in laboratorio.

Se si tratta di un aspirato intraoculare, va introdotto in provetta sterile, mantenuta a 25°C fino al momento della semina, che deve avvenire nel più breve tempo possibile dal momento prelievo.

I prelievi da condotto uditivo esterno e dalle narici, vanno eseguiti con tamponi secchi, ruotando la testa del tampone sulla zona lesionale.

Se si tratta di un aspirato gastrico, va neutralizzato possibilmente già nel contenitore di trasporto con un egual volume di carbonato di sodio.

Tabella 1

IL CAMPIONE PER ESAME MICOLOGICO (1)

Sui materiali di provenienza umana prelevati per la ricerca di miceti sono applicabili gli stessi principi generali validi per le indagini batteriologiche:

- stabilire il momento ottimale per il prelievo
- definire la zona colpita dal processo infettivo
- prelevare in quantità sufficiente
- prelevare prima dell'impiego di antimicotici
- scegliere idonei dispositivi di raccolta

Tabella 2

IL CAMPIONE PER ESAME MICOLOGICO (2)

L'isolamento culturale e la successiva identificazione dei miceti dai materiali biologici dipende dalle corrette procedure di raccolta e trasporto dei campioni

RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- raccolta in contenitori sterili
- invio tempestivo al laboratorio o conservazione a 4°C fino al momento dell'inoculo (eccetto per le emocolture)

Tabella 3

IL CAMPIONE PER ESAME MICOLOGICO (3)

Nella FASE PREANALITICA è di importanza fondamentale:

informare il laboratorio se il **SOSPETTO CLINICO** è di MICOSI (corretta accettazione ed identificazione del campione) in modo da predisporre:

- SEMINA IN IDONEI TERRENI SELETTI VI
- PARTICOLARI TEMPERATURE E TEMPI DI INCUBAZIONE

Tabella 4

<p style="text-align: center;">MICOSI SUPERFICIALI e CUTANEE</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">ricerca lieviti e dermatofiti</p> <ul style="list-style-type: none"> • SQUAME CUTANEE • ANNESSI CUTANEI • FRAMMENTI UNGUEALI <ul style="list-style-type: none"> - si conservano anche più giorni in contenitore sterile a secco • MATERIALE DA LESIONI UMIDE <ul style="list-style-type: none"> (pus, lesioni macerate o suppurate) - prelievo con tampone e semina in tempi brevi su idonei terreni selettivi

Tabella 8

<p style="text-align: center;">Tipi di campioni per esame micologico (2)</p> <ul style="list-style-type: none"> • PUS: se presenti granuli o frammenti solidi lavare con fisiologica sterile e frammentare con bisturi • SANGUE : prevedere tempi di incubazione prolungati (15-30 gg.) (esistono flaconi del commercio contenenti brodi specifici per la coltura fungina) • MIDOLLO OSSEO v. campioni di sangue • TESSUTI: Campioni Biopatici

Tabella 5

<p style="text-align: center;">MICOSI SOTTOCUTANEE</p> <p>(Sporotricosi, Cromomicosi, Maduromicosi) = lesioni granulomatose ad andamento cronico</p> <p>campioni biologici:</p> <ul style="list-style-type: none"> • PUS da raccolte chiuse • Biopsie di tessuti <p>- evidenziare l'eventuale presenza di granuli o frammenti solidi</p>

Tabella 9

<p style="text-align: center;">Quadri patologici sostenuti da lieviti del genere Candida</p> <ul style="list-style-type: none"> • Candidosi della cute e annessi cutanei • Candidosi delle mucose <ul style="list-style-type: none"> essud. cavo orale, ess. vulvo -vaginale, spazzol. esofageo.. • Candidosi profonde
--

Tabella 6

<p style="text-align: center;">MICOSI PROFONDE</p> <p>A) da FUNGHI PATOGENI PRIMARI (di importazione) (Istoplasmosi, Blastomicosi, Coccidioidomicosi) raccolta campioni con modalità analoghe ai prelievi per esami batteriologici</p> <p>B) da FUNGHI OPPORTUNISTI (sostengono patologie infettive in soggetti debilitati) <i>Candida spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Cryptococcus neoformans</i></p>

Tabella 10

<p style="text-align: center;">Ricerca Aspergillus spp.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Forme superficiali (es. otite esterna, cheratite) • Forme localizzate (es. aspergilloma polmonare) • Forme invasive (pz. immunodepressi) • ricerca di <i>Ag di Aspergillus</i> (su siero) - elevata sensibilità diagnostica
--

Tabella 7

<p style="text-align: center;">Tipi di campioni per esame micologico (1)</p> <ul style="list-style-type: none"> • CUTE ed ANNESSI CUTANEI • URINE : il primo campione del mattino (mitto intermedio) • ESS. FARINGEO/ CAVO ORALE • ESS. VAGINALE e URETRALE • SECREZIONI RESPIRATORIE : raccolta al mattino (espettorato indotto, BAL) • FECEI

Tabella 11

<p style="text-align: center;">Ricerca di CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</p> <p>Liquor cefalo- rachidiano - (almeno 3-5 ml); va esaminato tempestivamente - eventuale conservazione: non refrigerare</p> <p>ricerca <i>Ag cryptococcico</i> (su liquor e siero)</p>

Tabella 12

Ricerca di PNEUMOCYSTIS CARINII

- da liquido di lavaggio broncoalveolare
- da espettorato indotto
espettorato spontaneo: non idoneo (falsi negativi)

allestimento di preparati sottili e colorazioni
(Giemsa, blu di Toluidina O)

BIBLIOGRAFIA

1. Clinical microbiology procedures handbook. Isemberg , H.D., editor in chief: 1992 ASM. Washington, D.C.
2. La corretta metodica dei prelievi. AA vari. 1982. Manuali di servizio. Az..Osp..Pn
3. Viviani M.A., Torturano A.M.: Micologia medica e actinomiceti aerobi. AA.vari. AMCLI. Ghedini editore. Milano 1986