

Linee-guida per le indagini diagnostiche microbiologiche nello studio delle infezioni uretro-cervico-vaginali (aggiornata 2001)

Comitato di Studio AMCLI per le Infezioni Sessualmente Trasmesse non AIDS (CoSIST):

Coordinatore: Roberto Pozzoli

Segretario: Annamaria Cali

Barbara Suligoi, Pierangelo Clerici, Aldo Gasponi, Mario Rasso, Agnese Latino, Secondo Guaschino, Enrico Magliano.

1. INDAGINI MICROBIOLOGICHE VAGINALI

Le indagini devono accertare l'eziologia microbica di una sospetta vaginite (*Candida* spp, *Trichomonas vaginalis*), rilevare una condizione di vaginosi, valutare patologie da prevalenza in caso di dismicrobismo e uno stato di vaginosi citolitica.

La ricerca di altri eventuali germi potenzialmente patogeni è subordinata ad una valutazione microscopica preliminare che evidenzi un marcato dismicrobismo (es. deplezione di lattobacilli).

In età pediatrica l'indagine è indirizzata alla ricerca di *Candida* spp, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus* spp. Più raramente possono essere in causa Cocchi Gram positivi, Enterobacteriaceae e *Trichomonas vaginalis*.

In età menopausale e post-menopausale la presenza di Enterobacteriaceae (in particolare *E.coli*) quantitativamente significativa deve essere tenuta in considerazione per un possibile ruolo patogeno.

1.1 Modalità di prelievo

In via preliminare le pazienti devono essere istruite su alcune norme cui attenersi per rendere attendibile l'esito dell'esame ed in particolare:

- non avere rapporti sessuali nelle 24 ore precedenti l'esame;
- non essere in periodo mestruale;
- non eseguire irrigazioni vaginali nelle 24 ore precedenti l'esame;
- aver cessato qualsiasi intervento chemio-antibiotico locale o generale da almeno 3 giorni.

Il prelievo deve essere effettuato dal fornice posteriore vaginale mediante tamponi sterili previa introduzione di uno speculum bivalve sterile. Tali operazioni devono essere condotte da personale qualificato ed esperto (ginecologo, ostetrica, microbiologo medico).

Va sottolineata l'adozione di tutte le necessarie misure di sicurezza atte ad evitare ogni possibilità di contaminazione da una paziente all'altra e a salvaguardare l'operatore.

In gravidanza (Tampone vagino-rettale): Per la prevenzione dell'infezione neonatale da *Streptococcus agalactiae* (SGB) il tampone vaginale va eseguito verso la 35-36 settimana di gestazione.

Per questa finalità è necessario effettuare contemporaneamente la ricerca anche a livello rettale.

Età pediatrica: L'esame può essere eseguito su secrezioni vaginali; in casi di sintomatologia a carico dei genitali esterni può essere indicata l'esecuzione di un tampone vulvare.

1.2 Modalità di conservazione e di trasporto

- **Per l'esame colturale.** Il tampone deve essere introdotto subito dopo aver effettuato il prelievo dell'essudato vaginale nell'apposito terreno di trasporto che deve essere inviato al laboratorio o conservato a temperatura ambiente fino ad un massimo di 24 ore.

– **Per la coltura di *Trichomonas vaginalis***, il tampone con l'essudato raccolto deve essere stemperato al più presto nell'apposito terreno di trasporto/coltura che deve essere inviato prontamente in Laboratorio o conservato a temperatura ambiente.

– **Per l'allestimento del preparato a fresco e rilevazione di fishy odor test** in Laboratorio. Il tampone va stemperato subito dopo che l'essudato è stato raccolto in una provetta contenente 1 ml di soluzione fisiologica sterile preriscaldata a 37°C.

Per la determinazione di *Trichomonas vaginalis* la provetta deve essere mantenuta a tale temperatura in termostato fino al momento dell'osservazione microscopica. Per la determinazione di "fishy odor" vedi punto 1.4.

– **Preparato per la colorazione di Gram.** Una volta effettuata l'apposizione dell'essudato con un tampone, il vetrino si può conservare, asciugato e inserito nel contenitore di trasporto, a temperatura ambiente fino al momento della consegna al Laboratorio. È opportuno che il vetrino da sottoporre alla colorazione di Gram venga allestito al momento del prelievo e non dal tampone inviato al Laboratorio.

1.3 pH dell'essudato vaginale

Va misurato sempre e prima dell'inserimento dello speculum, utilizzando cartine indicatrici (a range ristretto 4-7 ad alta sensibilità) o piaccametri monouso per contatto con la parete laterale vaginale. È preferibile la determinazione lungo le pareti vaginali laterali perché a livello del fornice posteriore si possono verificare false alcalinizzazioni dovute alle secrezioni cervicali.

1.4 Fishy odor test

La rilevazione deve essere effettuata in complementarietà alla determinazione del pH; imprescindibile a pH >4. A tal fine si aggiunge una goccia di soluzione al 10% di KOH all'essudato vaginale deposto su un vetrino.

La positività consiste nella rivelazione olfattiva di un caratteristico odore di pesce avariato, causato dalla trasformazione delle amine eventualmente presenti nell'essudato dallo stato di sali non volatili alla forma libera volatile.

La determinazione può essere effettuata direttamente in sede di prelievo o in Laboratorio.

In quest'ultimo caso è necessario che l'essudato vaginale raccolto con un tampone vi pervenga stemperato in 1 ml di fisiologica sterile.

1.5 Esame microscopico

L'osservazione microscopica deve essere effettuata in laboratorio "a fresco" e previa colorazione di Gram.

Per l'esame "a fresco" ci si potrà avvalere della stessa provetta inviata per la determinazione del "fishy odor test".

È un'indagine da cui non si può prescindere perché consente lo studio dei seguenti importanti parametri che devono essere segnalati.

a1) **Valutazione morfotipica della flora batterica** ("a fresco" e dopo colorazione di Gram). È la fotografia in tempo reale del microbiota vaginale.

Le specie microbiche, distinte su base morfologica e tintoriale al Gram, devono essere rilevate in modo semiquantitativo (+, ++, +++).

In particolare deve essere sempre effettuata un'indicazione semiquantitativa della flora lattobacillare (assente, scarsa +, discreta ++, abbondante +++), perché consente una valutazione di base in tempo reale dello stato di competenza del microbiota vaginale, mentre la presenza di altri batteri deve essere presa in considerazione solo se prevalente e nel contesto di un evidente dismicrobismo o di un chiaro stato infiammatorio (assenza di lattobacilli, abbondante leucorrea...).

In assenza di flora lattobacillare l'evidenziazione di altra flora batterica quantitativamente non significativa va segnalata semplicemente come presenza di scarsa flora batterica in un contesto di dismicrobismo.

a2) **Valutazione dei miceti** (a “fresco e dopo colorazione di Gram)

Anche la presenza di miceti deve essere espressa in modo semiquantitativo (+, ++, +++).

All'osservazione microscopica *Candida* spp. è evidenziabile essenzialmente in due forme fenotipiche diverse, quella di **blastospore** (cellula rotondeggiante od ovale, singola o unita a due a due, spesso in via di moltiplicazione per gemmazione) e quella di **pseudoife o ifa** (filamenti tubuliformi).

Le blastospore sono le forme responsabili della trasmissione sessuale o della diffusione dell'infezione e la loro evidenziazione è indice di una colonizzazione vaginale residente, che decorre a volte in modo asintomatico.

La presenza di pseudoife o ife attesta, invece, in pazienti sintomatiche la natura infiltrativa della micosi.

Perché *Candida* spp. possa passare dalla fase di semplice colonizzazione o commensalismo a quella patogena-infiltrativa è necessario che si inneschi un meccanismo, quasi sempre multifattoriale, che porti ad un'alterazione del microbiota vaginale: azione citopatica diretta, produzione di tossine, alterazione del sistema immunitario umorale e cellulo-mediato, gravidanza, assunzione di contraccettivi orali, terapia antibiotica, diabete.

b) **Valutazione della eventuale presenza di “clue cells”** caratterizzate dall'adesione di batteri dalla forma coccobacillare alle cellule epiteliali vaginali (“a fresco” e dopo colorazione di Gram).

c) **Determinazione dello score** ricavato dal rapporto tra i diversi morfotipi batterici (*Lactobacillus* spp, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp, anaerobi) osservati al Gram come si evince dalla tabella 1.

– Dal punto di vista morfologico i lattobacilli si possono presentare a volte in modo pleiomorfo. Oltre che con la classica forma di bastoncini Gram positivi, si possono evidenziare come corti bastoncini ricurvi o come lunghi filamenti di batteri in sequenza.

– *Gardnerella vaginalis* appare sotto forma di sottili coccobacilli Gram negativi o Gram variabili.

– *Mobiluncus* spp. è osservabile come sottili e corti bastoncini ricurvi Gram negativi o, a volte, Gram variabili.

d) **Evidenziazione di casi di cosiddetta “vuginosi citolitica”** o “lattobacillosi vaginale”.

L'essudato vaginale può essere biancastro, schiumoso o caseoso con pH compreso tra 3.5 e 4.5 e all'osservazione microscopica si evidenzia un aumento abnorme di lattobacilli (spesso aderenti alle cellule epiteliali con aspetto simile alle “clue cells” della vaginosi batterica), una paucità di polimorfonucleati e un'evidente citolisi che mette in mostra nuclei nudi delle cellule lisate.

L'aspetto microscopico della vaginosi citolitica non deve essere confuso con un quadro abbastanza simile che si può osservare anche in preparati microscopici di essudati vaginali di donne in gravidanza.

Tabella1. Determinazione dello score in base ai morfotipi batterici osservati al Gram (Hillier S.L., 1993 mod.)

MORFOTIPI BATTERICI	PUNTEGGIO				
	0	1*	2*	3*	4*
Bastoncini Gram+ (<i>Lactobacillus</i> spp.)	4	3	2	1	0
Coccobacilli Gram-/variabili (<i>G.vaginalis/Bacteroides</i> spp.)	0	1	2	3	4
Bastoncini ricurvi Gram-/variabili (<i>Mobiluncus</i> spp.)	0	1	2	3	4

Punti: 0-3 Flora normale; 4-6 Dismicrobismo; 7-10 Vaginosi batterica;

1*, 2*, 3*, 4* esprimono il numero di batteri visti al Gram con ingrandimento 1000 x:

1*=<1; 2*=1-5; 3*=6-30; 4*=>30

e) **Presenza di *Bifidobacterium***: l'osservazione nell'essudato vaginale di bastoncini Gram positivi dalla caratteristica morfologia bifida, a Y o più raramente a ideogramma cinese è suggestiva di presenza di *Bifidobacterium*.

La sua colonizzazione solitamente rappresenta un ulteriore marcatore del dismicrobismo del microbiota vaginale. È opportuno, però, segnalarla solo se evidenziata in portatrici di IUD, perché *Bifidobacterium* è stato visto poter sostenere unitamente ad *Actinomyces* e ad altri anaerobi processi settici in tali pazienti.

Rarissima e di incerto significato è l'evidenziazione di microrganismi che si presentano come lunghi filamenti a capello (*Leptotrix*).

f) **Leucociti**: la presenza di leucociti deve essere espressa in modo semiquantitativo (+, ++, +++).

g) ***Trichomonas vaginalis***: vedi 1.7.6

1.6 Esame colturale

Deve essere eseguito il più presto possibile dal tampone appena prelevato o inviato al Laboratorio, obbligatoriamente in mezzo di trasporto.

Nei limiti delle possibilità temporali e organizzative di ciascun Laboratorio l'esecuzione dell'esame colturale deve essere differito dopo la valutazione microscopica che, se eseguita in modo corretto, può già di per sé indirizzare verso l'utilizzo degli opportuni e specifici terreni di coltura.

Il tampone va stemperato in 1 ml di fisiologica sterile, 100 ?l della quale vengono seminati per spatolamento su tutta la superficie dei seguenti terreni culturali (tabella 2).

La coltura di routine dei batteri anaerobi non deve essere eseguita.

Deve essere segnalata la loro presenza unicamente evincendola dall'esame microscopico (presenza di *Mobiluncus* spp, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* spp) nell'ambito di una diagnosi di dismicrobismo del microbiota vaginale o di vaginosi batterica.

Tabella 2. Terreni di coltura, atmosfera, temperatura e tempo di incubazione

TERRENO	BATTERI	ATMOSFERA DI INCUBAZIONE	TEMPERATURA DI INCUBAZIONE	TEMPO DI INCUBAZIONE
Sabouraud	Miceti	Aerobiosi	37°C	24 h
Dextrose agar + gentamicina solfato (100mg/L) e/o cloramfenicolo (0.5g/L)				
Mac Conkey agar	Enterobatteri	Aerobiosi	37°C	24 h
Columbia CNA agar +	Streptococchi	5% CO ₂	37°C	24 h
sangue defibrinato sterile di montone (5%), ac.nalidixico (15mg/L), colistina solfato (10mg/L)	<i>L.monocytogenes</i>	5% CO ₂	37°C	48 h

Nota 1: I tamponi vulvari eseguiti in età pediatrica devono essere sempre seminati per la coltura di *Streptococcus pyogenes* su Columbia CNA agar sangue e di *Haemophilus* spp anche su Agar cioccolato che va incubato a 37°C per 24 ore in tensione di CO₂ al 5%.

Nota 2: Nei casi di interpretazione microscopica dubbia e per un conseguente approfondimento diagnostico è consigliata la semina su altri terreni specifici (per esempio per l'isolamento di *Gardnerella vaginalis* e di *Lactobacillus* spp) (tabella 3).

Tabella 3. Terreni specifici, atmosfera e tempo di incubazione per la coltura di *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus* spp

TERRENO	BATTERI	ATMOSFERA DI INCUBAZIONE	TEMPERATURA DI INCUBAZIONE	TEMPO DI INCUBAZIONE
Columbia agar base + sangue defibrinato sterile umano (10%), gentamicina solfato (4 mg/L), ac.nalidixico (30 mg/L), amfotericina B (2 mg/L)	<i>Gardnerella vaginalis</i>	5% CO ₂	37°C	48 h
Rogosa agar	<i>Lactobacillus</i> spp.	5% CO ₂	37°C	48h

1.7 Identificazione

1.7.1 *Lactobacillus* spp

La speciazione dei lattobacilli o la differenziazione tra le specie H₂O₂ produttori e H₂O₂ non produttori riveste esclusivamente carattere di ricerca.

1.7.2 *Gardnerella vaginalis*

Va ribadito che la coltura e l'identificazione di *Gardnerella vaginalis* possono essere eseguite solamente nel caso in cui vi siano dubbi interpretativi quando l'esame microscopico di per sé non è diagnostico (punto 1.6, nota 2).

L'identificazione si basa sulle caratteristiche morfologico-tintoriali (coccobacilli Gram-/variabili), sulla negatività della reazione alla catalasi, sulla presenza della beta-emolisi (ben evidenziabile in 48 h su terreni addizionati di sangue umano e non animale) e sullo studio di alcune caratteristiche biochimiche evidenziabili utilizzando sistemi miniaturizzati.

Come test di conferma, è sufficiente la ricerca dell'idrolisi dell'ippurato.

Un sistema semplice per valutare l'idrolisi dell'ippurato, caratteristica essenziale per la completa identificazione di *Gardnerella vaginalis*, utilizza dischetti di carta bibula imbevuti di ippurato di sodio:

- Distribuire in una provetta 0.4 ml di acqua distillata sterile e aggiungere un dischetto di ippurato.
- Stemperare un'abbondante ansata della coltura batterica in esame e agitare fino a formare una sospensione omogenea.
- Incubare la provetta in termostato o in bagnomaria a 37°C per 2 ore.
- Aggiungere, dopo l'incubazione, 0.2 ml di ninidrina (soluzione al 3.5% in acetone/butanolo) e agitare delicatamente.
- Reincubare la provetta per 15 minuti e leggere la reazione colorimetrica.

La reazione positiva stante ad indicare la produzione di ippuricasi che idrolizza l'ippurato di sodio è data dalla comparsa nella soluzione di un colore porpora-blu.

1.7.3 *Listeria monocytogenes*

Come è noto *Listeria monocytogenes* può sostenere una gravissima, seppur rara, setticemia neonatale che si manifesta nei primi giorni di vita in seguito all'infezione contratta durante la vita intrauterina o con il passaggio nel canale del parto. Il microrganismo può essere coltivato su terreno Columbia CNA agar addizionato di sangue defibrinato di montone, colistina e acido nalidixico già utilizzato per la coltura degli streptococchi.

Esso si sviluppa lentamente a 37°C in aerobiosi o in tensione di CO₂ al 5% manifestando colonie piccole, grigie, traslucide circondate da un piccola zona di α -emolisi.

La diagnosi differenziale con la β -emolisi prodotta da Streptococchi β -emolitici che crescono sullo stesso terreno di coltura è basata sull'osservazione morfotipica alla colorazione di Gram di preparati allestiti dalle colonie isolate. *Listeria monocytogenes* si presenta come un corto bacillo Gram-positivo.

L'identificazione oltre alle caratteristiche menzionate verte anche sui seguenti test:

- Ricerca della Catalasi (positiva).
- Fermentazione di glucosio, trealosio e salicina (presente).
- Idrolisi dell'esculina (positiva).
- Mobilità a 25°C. Può essere eseguita sia con il metodo della goccia pendente su apposito vetrino concavo nella sua parte centrale o in agar molle in cui la mobilità del batterio si evidenzia con la caratteristica crescita a ombrello sotto la superficie dell'agar.
- Immobile a 37°C.
- Ricerca della produzione di H₂S (negativa).
- Arricchimento a 4°C. Poiché *L. monocytogenes* può essere isolata con difficoltà da materiali soprattutto biotici, in casi eccezionali, si può ricorrere all'arricchimento a freddo.

Una parte del materiale va mescolata con 9 parti di terreno di coltura costituito da Trypticase soy broth che va incubato a 4°C fino a 60 giorni e si eseguono controlli periodici mediante trapianti in CNA agar addizionato per controllare l'eventuale crescita.

1.7.4 Miceti

Si deve procedere all'identificazione dei miceti con speciazione almeno di *Candida albicans*.

Un semplice e irrinunciabile metodo che consente in breve tempo di speciare *Candida albicans* (la specie più frequentemente isolata dall'essudato vaginale) è il "germ-tube test" o test di filamentazione:

- Alcune colonie (5, 6) formatesi su Sabouraud agar vengono stemperate in una provetta contenente 1 ml di siero.
- Si incuba a 37°C per 4 ore.
- Si procede all'allestimento di un vetrino a fresco che viene sottoposto all'osservazione microscopica.
- La presenza di "germ-tube" (piccoli filamenti protudenti dalla superficie esterna della blastospora) consente la definizione di specie di *Candida albicans*.

Per l'identificazione delle altre specie di miceti si utilizzano i test di assimilazione degli zuccheri e il test di resistenza all'actidione.

Questi test sono facilmente eseguibili ricorrendo all'uso di piastrine disponibili commercialmente formate da microgallerie in cui sono presenti i substrati da saggiare in forma liofila.

Le gallerie una volta inoculate vengono lette dopo 48 h di incubazione a 30°C (es. sistema auxacolor).

1.7.5 *Streptococcus agalactiae* (SGB)

Può essere isolato su agar-sangue (o dopo arricchimento in un terreno liquido selettivo come il Todd-Hewitt broth). Le colonie crescono presentando la tipica beta-emolisi anche se alcuni stipiti eccezionalmente sono non emolitici. L'identificazione finale verte sulla rilevazione degli antigeni polisaccaridici gruppo-specifici che può essere preceduta da quella presuntiva basata sulla positività al test dell'idrolisi dell'ippurato.

NB: La sua ricerca può essere estesa nella gestante anche sulle urine.

1.7.6 *Trichomonas vaginalis*

I metodi che il Laboratorio ha a disposizione per la ricerca di *Trichomonas vaginalis*, sul secreto vaginale sono molteplici (di seguito compendati per praticità). In particolare l'esame microscopico a fresco, la coltura, la determinazione diretta dell'antigene.

La ricerca può essere effettuata su sedimento urinario mediante esame a fresco o coltura.

a) **Esame microscopico.** Tra i metodi menzionati nella tabella 4 senza dubbio il più diffuso e quello di più facile attuazione è l'esame "a fresco":

L'essudato vaginale deve essere raccolto con tampone e posto in provetta contenente 1 ml di soluzione fisiologica mantenuta a 37°C per 15 minuti.

Si allestisce quindi il vetrino "a fresco" che deve essere osservato subito al fine di evitare l'inibizione della mobilità del protozoo che unitamente alla morfologia risultano essere i caratteri specifici per l'identificazione.

b) **Esame colturale:** rappresenta il "gold standard" per sensibilità e specificità.

L'essudato prelevato con il tampone deve essere stemperato subito al momento del prelievo in provette contenenti 5ml di terreno specifico rappresentato dal CPLM *Trichomonas* broth con aggiunta di Streptomina (1000 ?g/ml), Penicillina (1000 U/ml), Cloramfenicolo (50 ?g/ml) e siero sterile di cavallo (50 ml/L) preriscaldato a 37°C.

L'incubazione va effettuata a 37°C per 5 giorni. Giornalmente dal 2° al 5° giorno viene allestito un preparato a fresco per l'osservazione microscopica della tipica morfologia.

NB: Sono reperibili in commercio terreni di coltura già pronti all'uso.

Tabella 4. Metodi microscopici per la ricerca di *Trichomonas vaginalis*

METODO
"A fresco"
Colorazione Papanicolau
Colorazione violetto di genziana (0.1%)
Colorazione acridin-orange (1:30000)
Perossidasi diretta
Immunofluorescenza diretta

c) **Ricerca diretta dell'antigene:** la presenza di *Trichomonas vaginalis* può essere anche evidenziata ricercando l'antigene mediante un metodo immunoenzimatico.

Tra i più diffusi vi è quello che utilizza micropiastre con anticorpi adesi alla fase solida che presenta però una sensibilità minore rispetto alla coltura.

1.8 Antibiogramma e antimicogramma

L'antibiogramma sui microrganismi isolati non va di regola eseguito.

Può fare eccezione l'antibiogramma eseguito su *Streptococcus agalatae* se isolato da donne con gravidanza a termine nei casi di ipersensibilità nota della paziente alle beta-lattamine.

L'antimicogramma viene consigliato solo eccezionalmente se si è in presenza di infezioni ricorrenti particolarmente difficili da eradicare.

È eseguibile ricorrendo all'uso dell'E-Test

1.9 Interpretazione

Nell'esaminare l'essudato vaginale il Microbiologo non può prescindere dalla complessa dinamica del microbiota vaginale e dalla consapevolezza che il materiale allo studio è per propria natura polimicrobico.

Se l'esame microscopico e colturale dimostrano la presenza di quadri morfotipici patognomonic (vaginosi batterica) o l'isolamento significativo di specie con attribuzione patogena (es. miceti, *Trichomonas vaginalis*) la conclusione diagnostica viene a coincidere con tali dimostrazioni.

Viceversa, l'interpretazione del dato microbiologico diviene critica quando, a contro di segni obiettivi di uno stato infiammatorio posti in evidenza dal Ginecologo e/o di una sintomatologia soggettiva denunciata dalla paziente, l'esame microbiologico evidenzia esclusivamente specie batteriche residenti.

In questi casi nasce l'esigenza di stabilire se tali popolazioni residenti possano in quel momento giocare un ruolo importante nel determinismo dell'affezione in essere.

Importanza rilevante assume in questo contesto la valutazione semiquantitativa comparata delle diverse specie batteriche presenti nell'essudato vaginale. In via preliminare l'attenzione deve essere posta alla flora lattobacillare (tenendo conto del suo dinamismo nelle varie età della vita) al fine di valutare l'equilibrio del microbiota vaginale.

È quasi superfluo ricordare che nel refertare l'assenza di lattobacilli nell'essudato vaginale bisogna considerare e sottolineare l'età della paziente.

In età prepuberale i lattobacilli sono, infatti, scarsi e nel periodo climaterico in assenza di terapia ormonale sostitutiva sono assenti.

Nell'età fertile, la presenza di una flora lattobacillare abbondante o comunque discreta è sicuramente indice di un buon controllo della situazione vaginale ed è garanzia di un normale equilibrio di rapporto delle diverse specie residenti nel distretto preso in esame.

Indagini più sofisticate che esulano dalla normale routine possono mettere in evidenza aspetti qualitativi della flora lattobacillare in particolare la distinzione tra ceppi H₂O₂ produttori e H₂O₂ non produttori.

Se, al contrario, i lattobacilli sono poco rappresentati ci troviamo di fronte ad uno stato di possibile dismicrobismo che può favorire l'azione opportunistica di membri del microbiota residente in casi particolari.

La sola presenza di *Gardnerella vaginalis*, possibile indicatore di vaginosi batterica, non accompagnata da alcun altro marcatore (pH alcalino, deplezione di lattobacilli soprattutto di quelli H₂O₂ produttori, presenza di "clue cells", presenza di *Mobiluncus* o anaerobi) non è condizione sufficiente per porre diagnosi dell'affezione vaginale essendosi il batterio ritrovato anche nel 20-40% delle donne sane come facente parte della flora residente (un caso particolare è quello della gestante con rischio di rottura prematura delle membrane PROM).

Va, inoltre, ribadito che la presenza di alcuni batteri quali stafilococchi coagulasi negativa, enterococchi, ed enterobatteri a bassa carica non vanno presi in considerazioni e pertanto non vanno segnalati a meno che si sia in presenza di un'evidente dismicrobismo testimoniato da una totale assenza di lattobacilli e da uno stato flogistico importante evidenziato dalla presenza di un elevato numero di leucociti.

In particolare *S. aureus*, pur facendo parte della flora residente, deve essere segnalato anche se in coltura mista quando associato a ascessi labiali, ulcerazioni vaginali o in caso di toxic shock syndrome.

Deve essere sempre valutata come significativa e pertanto refertata, la presenza in coltura pura di *S. aureus* ed *Enterobacteriaceae*.

2. INDAGINI MICROBIOLOGICHE CERVICALI

La ricerca a livello cervicale è volta ad accertare routinariamente la presenza di *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* in donne che presentino segni di cervicite oppure che stiano eseguendo indagini a scopo preventivo (gravidanza, infertilità, gruppi a rischio, ecc...).

La ricerca di *Mycoplasma/Ureaplasma* deve essere eseguita tenendo conto che non essendo possibile considerare le suddette specie “patogene convenzionali” sorge l’esigenza di costruire la determinazione del “nesso eziologico” mediante una attenta valutazione del complesso equilibrio batterico dell’ecosistema.

2.1 Modalità di prelievo

In via generale valgono le norme preliminari cui le pazienti devono attenersi prima di sottoporsi all’indagine espresse al punto 1.1

Il prelievo deve essere effettuato a livello endocervicale, previa introduzione di uno *speculum* bivalve sterile, nel modo seguente:

- rimuovere l’eccesso di muco cervicale mediante un tampone “a secco”;
- inserire un secondo tampone o un “cyto-brush” nell’endocervice per circa 1 cm. e ruotare più volte. Per la ricerca di *Chlamydia trachomatis* il tampone va inserito per 1.5 cm oltre la giunzione squamosa.

NB: La donna gravida può essere sottoposta al prelievo, ad esclusione dell’ultimo trimestre, a livello dell’esocollo.

2.2 Modalità di conservazione e di trasporto

- **Coltura di *Neisseria gonorrhoeae*.** È consigliabile seminare il tampone subito dopo la raccolta su piastra di Agar cioccolato o Agar Thayer Martin preriscaldata a 37°C.
- **Coltura di *Mycoplasma/Ureaplasma*.** Il tampone con il materiale raccolto deve essere stemperato nell’apposita provetta contenente il terreno di trasporto/arricchimento che può essere conservata in frigorifero fino al momento della consegna in Laboratorio (non oltre la mattina del giorno successivo a quello del prelievo).
- Ricerca di *Chlamydia trachomatis* (metodo EIA). Reinserire il tampone nella provetta di trasporto e conservare a temperatura ambiente o a +4 °C fino al momento della consegna in Laboratorio (non oltre la mattina del giorno successivo).
- Vetrino per ricerca di *Chlamydia trachomatis* (metodo IFD). Strisciare il tampone o il cyto-brush per tutta la superficie dell’area circolare ricavata dal vetrino. Asciugare all’aria e fissare versando il contenuto della fiala del kit sul vetrino lasciando agire per almeno 5 minuti. Conservare a temperatura ambiente o a +4°C.

Il vetrino dovrebbe essere colorato entro 7 giorni dal prelievo. Se si esamina oltre questo periodo è consigliabile conservarlo a -20°C.

- Vetrino per colorazione di Gram. Allestire il vetrino ruotando il tampone con il materiale prelevato, lasciare asciugare all’aria e conservare nel contenitore di trasporto.

2.3 *Neisseria gonorrhoeae*

2.3.1 Esame microscopico dopo colorazione di Gram

Il vetrino deve essere allestito al momento del prelievo e non dal tampone inviato al Laboratorio. Indispensabile per mettere in evidenza la presenza diretta nell'essudato endocervicale di *Neisseria gonorrhoeae*.

2.3.2 Esame colturale

Per la ricerca di *Neisseria gonorrhoeae* è consigliato seminare al momento del prelievo il materiale prelevato con tampone sterile sui terreni di coltura Agar cioccolato e Agar Thayer-Martin modificato preriscaldati in termostato per 5'.

Altrimenti il tampone deve essere inviato il più presto possibile al Laboratorio in apposito terreno di trasporto che deve essere assolutamente privo di glicerolfosfato.

Nel terreno di Stuart-Amie i gonococchi sopravvivono sino a 12 ore.

Il tampone prelevato si deve sempre conservare a temperatura ambiente.

I terreni, una volta seminati, devono essere incubati a 37°C in atmosfera di CO₂ al 5% per 48 h.

È consigliabile eseguire accanto all'antibiogramma lo studio della produzione di beta-lattamasi da parte di *Neisseria gonorrhoeae*.

2.4 Ricerca di *Chlamydia trachomatis*

2.4.1 Esame microscopico

– Pap-test: l'importanza di questo test è stata decisamente ridimensionata perché non ha dimostrato sufficiente specificità. L'immagine di cellule metaplasiche con vacuolo contenente materiale finemente granulare, associata ad un quadro infiammatorio, rappresenta solo un'immagine suggestiva di infezione cervicale da *Chlamydia trachomatis* che deve obbligatoriamente trovare conferma con tecniche più specifiche.

Secondo dati in letteratura l'immagine morfologica sospetta verrebbe confermata in non oltre il 10% dei casi.

– Immunofluorescenza diretta: è la metodica più rapida e più diffusa nei laboratori e consente di valutare la cellularità o meno del campione e quindi la sua idoneità.

Sul vetrino strisciato con il materiale cervicale e fissato con apposito fissativo viene deposta una goccia di antisiero contenente anticorpi monoclonali rivolti verso le proteine del MOMPS e contro LPS di *Chlamydia trachomatis*.

Dopo incubazione a T ambiente per 30 minuti i corpi elementari, se presenti, appariranno al microscopio a fluorescenza come spots perfettamente rotondeggianti di 300 nm dalla brillante fluorescenza verde mela.

La sua correlazione con la coltura, che rappresenta il metodo di riferimento è abbastanza elevata e supera il 90% se si considera, come proposto attualmente, il cut-off positivo/negativo di almeno 2 corpi elementari.

L'utilizzo di entrambi gli anticorpi monoclonali limita la possibilità di fasi positivi dovuti alla cross-reattività con la proteina A di *Staphylococcus* spp.

NB: Adeguatezza del prelievo: la presenza di cellule epiteliali colonnari cuboidi dimostra l'idoneità del prelievo, mentre la presenza di sole poche cellule, di eccessivo muco cervicale e la prevalenza di cellule epiteliali squamose rendono il prelievo non idoneo.

2.4.2 Esame colturale

È il metodo di riferimento eseguito solamente in pochissimi centri di riferimento e consiste nella semina di materiale patologico inviato al laboratorio in apposito terreno di trasporto (può essere

eventualmente conservato a -70°C fino al momento della semina) in linee cellulari idonee come terreni di coltura.

Più utilizzate sono le cellule McCoy trattate con Rx e cicloeximide al fine di rallentare le sintesi molecolari in modo da rendere disponibili i metaboliti per *Chlamydia trachomatis*. Dopo 48-72 ore di incubazione a 37°C i monostrati cellulari vengono saggiati con anticorpi monoclonali fluoresceinati al fine di ricercare mediante osservazione microscopica a fluorescenza le inclusioni tipiche del ciclo riproduttivo di *Chlamydia*.

In alternativa all'immunofluorescenza si possono utilizzare tecniche di immunoperoxidasi o sonde genetiche.

La coltura in quanto consente di evidenziare anche basse cariche di *Chlamydia trachomatis* presenti nei campioni presenta un'elevatissima sensibilità che si può ancor più aumentare se si procede all'effettuazione di sottocolture blind.

Va sottolineato come alcuni campioni biologici (liquido amniotico, aspirato endometriale, endotubarico, sperma) abbiano dimostrato un'attività inibitoria sulla crescita in coltura di *Chlamydia trachomatis*.

L'isolamento in colture cellulari può, pertanto, essere eseguito solo in Laboratori altamente specializzati in grado di garantire la qualità e l'idoneità delle linee cellulari e la corretta performance del test.

2.4.3 Test immunoenzimatici

La metodica immunoenzimatica permette la ricerca dell'antigene di *Chlamydia trachomatis*. Offre il vantaggio di un facile trasporto del campione, una buona standardizzazione della lettura fotometrica e tempi di esecuzione contenuti, ma ha il grave inconveniente di non visualizzare la cellularità del campione che ne garantisce l'idoneità. Inoltre, si possono verificare dei "falsi positivi" in pazienti in cui non sono presenti microrganismi viventi, ma solo antigeni come avviene dopo trattamento terapeutico.

2.4.4 Biologia molecolare

L'impiego di sonde biotinate (probes) mediante ibridizzazione *in situ* ha messo in evidenza una sensibilità di circa il 60% (rivelazione mediante sistema streptoavidina-perossidasi biotinilata) legata in gran parte alla scarsa componente del DNA cellulare e ai rischi di alterazione durante la fase di denaturazione della doppia elica.

L'ibridizzazione DNA/RNA è una metodica in chemiluminescenza che aumenta la sensibilità di risposta perché permette l'ibridizzazione tra il DNA/probe marcato con un estere di acridinio e l'rRNA di *Chlamydia trachomatis* presente già in singola elica ed in grande quantità nella fase attiva di replicazione.

L'applicazione dei probes è stata affiancata dall'utilizzo di più recenti tecnologie di biologia molecolare previa amplificazione (PCR, LCR, SDA isoterma).

La Strand Displacement Amplification permette simultaneamente l'amplificazione e il rilevamento in tempo reale con ottimi risultati di sensibilità e specificità.

Mediante PCR, seppur con le limitazioni e le attenzioni che il metodo ancora richiede (inibitori, contaminazioni, costi) si ottengono risultati a più elevata sensibilità e specificità (è il test che possiede la massima sensibilità).

La LCR (Ligase Chain Reaction) con tecnica di amplificazione del DNA plasmidico ha dato risultati molto soddisfacenti anche su urine aprendo grandi possibilità di screening non invasivo su popolazioni selezionate.

2.5 Ricerca di Mycoplasma/Ureaplasma

Si ribadisce che la ricerca riveste un significato patognomonico solo se condotta su secreto cervicale o uretrale e non su essudato vaginale.

Lo studio dei micoplasmi può essere effettuato con sistemi che si differenziano sia per tecniche impiegate sia per i principi su cui si basa l'indagine.

Alcuni vertono su tecniche tintoriali con coloranti, quali la bisbenzamide, capaci di evidenziare la presenza del genoma dei micoplasmi nelle cellule coltivate su vetrino, altri si basano su test biochimici o immunoenzimatici, altri ancora ne evidenziano la presenza mediante ibridizzazione di DNA o rRNA mediante DNA-probe, altri infine ne consentono la coltivazione su appositi terreni selettivi.

A queste tecniche si deve aggiungere la possibilità di un'indagine mediante PCR soprattutto indirizzata all'evidenziazione di quei micoplasmi genitali difficilmente coltivabili come *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma fermentans*.

I sistemi colturali sono, comunque, quelli maggiormente utilizzati in quanto la maggior parte di essi abbina allo studio delle attività metaboliche la possibilità di un esame morfologico microscopico delle colonie cresciute su agar che ne consentono una definitiva identificazione.

Alcuni sistemi di coltura /identificazione, infatti, sono costituiti da un terreno di trasporto, in cui il tampone con il materiale prelevato deve essere stemperato e un terreno liofilo, che deve essere reidratato con il terreno di trasporto, contenente gli elementi necessari alla crescita di micoplasmi, i substrati specifici (urea, arginina), un indicatore di viraggio del colore legato all'aumento del pH e una miscela di antibiotici tale da rendere selettivo il terreno.

Con tre gocce di questo terreno, una volta ripreso, si deve seminare anche una piastrina agarizzata che consente lo studio al microscopio della morfologia delle colonie di micoplasmi cresciuti.

Altri sistemi di coltura presenti in commercio associano al terreno di trasporto/coltura una galleria comprendente cupole contenenti substrati di identificazione e antibiotici liofilizzati che devono essere reidratati con il brodo.

Questo insieme di cupole permette di identificare i micoplasmi, di determinare la carica ed il comportamento dello stipite isolato di fronte agli antibiotici secondo concentrazioni critiche.

La coltura rappresenta, quindi, il metodo di riferimento e quello consigliato e l'identificazione deve essere sempre accompagnata dalla valutazione semiquantitativa del cut-off di carica (10000 UFC/ml) al di sopra del quale si può attribuire un ruolo patogeno al microrganismo.

Valori al di sotto devono essere considerati come indice di semplice commensalismo.

3. INDAGINI MICROBIOLOGICHE URETRALI

L'esame ha la finalità di individuare l'agente eziologico di uretrite.

Devono essere ricercati routinariamente *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, Micoplasma/Ureaplasma, *Trichomonas vaginalis* (raro).

Possono essere ricercati anche altri eventuali patogeni quali *Staphylococcus aureus* e *saprophyticus*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* ed *Enterobacteriaceae* che comunque devono essere valutati, prima della refertazione, circa la loro significatività.

3.1 Modalità di prelievo

Valgono le norme generali cui le pazienti devono attenersi prima di essere sottoposte all'esame espresse nel punto 1.1. Si precisa inoltre che la paziente non deve aver urinato da almeno 3 ore.

Il prelievo viene effettuato introducendo delicatamente per circa 1 cm un sottile tampone nell'uretra dopo aver rimosso con un tampone "a secco" l'eventuale presenza di muco.

3.2 Modalità di conservazione e di trasporto

Valgono quelle descritte nei punti 1.2 (la ricerca di *Trichomonas vaginalis* può essere eseguita anche a livello uretrale) e 2.2.

3.3 Esame microscopico previa colorazione di Gram

È utile per la valutazione della flogosi e come indicatore di un'eventuale contaminazione vaginale (es presenza di lattobacilli).

3.4 Esame colturale

Il materiale deve essere seminato sui terreni di coltura descritti nella tabella al punto 1.6 con l'aggiunta di Agar cioccolato che deve essere incubato a 37°C in tensione di CO₂ al 5%.

3.5 Ricerca di *Trichomonas vaginalis*

Si applicano le stesse metodiche descritte nel punto 1.7.6).

3.6 Ricerca di *Chlamydia trachomatis*

I metodi di ricerca validi sono gli stessi di quelli descritti al punto 2.4.

3.7 Ricerca di Micoplasma/Ureaplasma

La ricerca viene eseguita seguendo le stesse modalità descritte nel punto 2.5.

Per una più completa gestione microbiologica degli accertamenti delle infezioni uretro cervico vaginali, è fondamentale la formulazione di una scheda di richiesta che accompagni i materiali da esaminare (figura I) e di una refertazione dettagliata (tabella 5).

Tabella 5. *Indicazioni per la refertazione*

SUGGERIMENTI PER LA REFERTAZIONE DEGLI ESAMI

Deve essere specificato il metodo con cui la ricerca è stata effettuata.

È possibile prevedere in calce al referto un breve commento esplicativo.

Comunque la refertazione dovrebbe essere più semplice e chiara possibile e soprattutto uniformata affinché i dati prodotti possano essere confrontabili con altri laboratori ed entrare in un circuito informatico che permetta una elaborazione a livello, possibilmente, nazionale.

1. Prelievo Vaginale

1.1 La refertazione della ricerca vaginale dovrà contenere i risultati delle determinazioni del pH, della produzione di amine (fishy odor) e oltre ad una valutazione microscopica sulla componente flogistica e microbica, l'attribuzione del relativo score.

1.2 Dovrà essere refertata la presenza dei più significativi microrganismi che possono essere responsabili nella flogosi vaginale e segnalata la presenza o meno della flora lattobacillare (possibilmente con una valutazione semiquantitativa in +).

1.3 Nel caso sia presente un dismicrobismo vaginale l'isolamento di altri germi va segnalato con una indicazione semiquantitativa della carica (in +). Solo nel caso in cui al germe isolato, anche sulla base di una completa valutazione della storia clinica di immunocompetenza e delle terapie pregresse, venga attribuita una significatività patognomonica dovrà essere eseguito l'antibiogramma.

2. Prelievo cervicale

2.1 La refertazione dovrà riportare la valutazione della componente flogistica (presenza di polimorfonucleati) espressa in + e il risultato della ricerca di *Neisseria gonorrhoeae*, di *Chlamydia trachomatis* e di *Mycoplasma spp*, *U.urealyticum*.

2.2 In caso di positività per *Neisseria gonorrhoeae* va refertato l'antibiogramma e il risultato del test della b-lattamasi.

2.3 In caso di positività per *Mycoplasma spp*, *U.urealyticum* va refertato l'antibiogramma.

3. Prelievo uretrale

3.1 La refertazione deve riportare una valutazione sulla componente flogistica ed il risultato della ricerca di *Neisseria gonorrhoeae*, di *Chlamydia trachomatis*, di *Mycoplasma spp*, *U.urealyticum* e di *Trichomonas vaginalis*.

3.2 La refertazione di altri possibili patogeni deve essere fatta solo in caso di una loro significatività patognomonica.

3.3 In caso di positività per *Neisseria gonorrhoeae* va refertato l'antibiogramma e il risultato del test per la produzione di b-lattamasi.

3.4 In caso di positività per *Mycoplasma spp*, *U.urealyticum* va refertato l'antibiogramma.

3.5 Qualora risultasse significativo l'isolamento di un altro germe potenzialmente patogeno è opportuno refertare il relativo antibiogramma.

Intestazione del Laboratorio
ESAME MICROBIOLOGICO URETRO-CERVICO-VAGINALE

Cognome
Nome
Data di nascita
Nazionalità

Provenienza
Data
Ora prelievo
Codice sanitario

Dati clinici e abitudini di igiene personale

Ectropion ?No ?Sì
Infertilità ?No ?Sì
Partner sintomatico per

Terapia ultimi 7 giorni ?No oSì
Uso abituale tamponi interni ?No ?Sì
Lavande vaginali ultime 48 h?No ?Sì

Sintomatologia

?No ?Sì
 ?Prurito
?Bruciore a) interno b) esterno
?Leucorrea a) scarsa b)abbondante
 c) bianca d) colorata
 e) maleodorante f) densa
 g) fluida
?Secchezza delle mucose
?Perdite ematiche intermestruali
?Dolori pelvici a) unilaterali b) diffusi
 c) occasionali d) frequenti
?Dispareunia a) vaginale b) interna
?Minzione a) pollachiuria b) bruciore

Contracezione **ultimi 6 mesi** ?No ?Sì tipo _____

Data ultima mestruazione _____

Gravidanza ?No ?Sì settimana gestazionale _____

Menopausa ?No ?Sì ?in terapia ormonale sostitutiva

pH vaginale: _____ **Fishy odor** ?No ?Sì

ESAMI MICROBIOLOGICI RICHIESTI

? TAMPONE VAGINALE:	? TAMPONE CERVICALE:	? TAMPONE URETRALE:
Esame microscopico	Esame microscopico	Esame microscopico
Esame colturale standard	Esame colturale per gonococco	Esame colturale standard
Ricerca <i>Trichomonas</i>	Ricerca <i>Micoplasma/Ureaplasma</i>	Ricerca <i>Trichomonas</i>
	Ricerca <i>Chlamydia</i>	Ricerca <i>Micoplasma/Ureapl</i>
		Ricerca <i>Chlamydia</i> .

? TAMPONE VAGINO-RETTALE:
Ricerca SGB

? TAMPONE VULVARE :
Esame microscopico
Esame colturale standard

? URINE:
Ricerca *Chlamydia*
Ricerca *Trichomonas*

Firma

BIBLIOGRAFIA

1. AIDS 1997; 11 (Suppl. 2).
2. Cassel GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. Ureaplasma urealyticum intrauterine infections: role in prematurity and disease in newborns. Clinical Microbiology Review 1993; 6 (1): 69-87.
3. Cianci A, De Cecco L, Gorliero F, et al. Nuove acquisizioni nella diagnosi e terapia della vaginosi batterica. Simposio "La vaginosi batterica". Congresso SIGO, Venezia, ottobre 1993.
4. Cibley LJ, Cibley L. Cytolytic vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1991; 165 (4) parte 2: 1245-9.
5. Couture B. Bacteriologie medicale. Decarie Editeur. III Ed 1997.
6. Cumitech 17 A. Laboratory diagnosis of female genital tract infections. June 1993.
7. Guaschino S, Grimaldi E, De Seta F, et al. Epidemiology of vulvovaginal candidiasis. The 3rd Congress of the European Society for Gynecologic and Obstetric investigation. March 9-15, 1997; P33.
8. Hillier SL. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol. August 1993; 455-9.
9. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 1992; 1.11, 1.19, 1.20, 8.23, 8.24.
10. Magliano EM, Pozzoli R, Clerici P. Atlante-guida di microscopia vaginale. AMCLI, Biomedica 1998.
11. Mandell GL, Dolin R, Bennett JE. Mandell, Douglas and Bennett's: Principles and practice of infections diseases. Fourth Edition Churcill Linvingstone Inc, 1995; 87-91,157,162,190,204,236,260.
12. Pozzoli R, Gallina P, Astolfi A. Infezioni genito-urinarie da Mycoplasma. Microbiologia Medica 1995; 10 (1) suppl: 307-13.
13. Recommendations and reports 1998. Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. CDC Atlanta. January, 23 1998 MMWR; 47 (RR-1).
14. Rosenstein IJ, Fontaine EA, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Relationship between hydrogen peroxide producing strains of lactobacilli and vaginosis - associated bacterial species in pregnant women. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16 (7): 517-22.

Autore di riferimento:

Roberto Pozzoli

Laboratorio di Microbiologia e Virologia

A.O. Ospedale Niguarda Ca' Granda

P.zza dell'Ospedale Maggiore 3

20162 Milano

Tel. 02 64 44 26 67; Fax. 02 64 44 29 01

e-mail: enrico.magliano@galactica.it

