

4. PRELIEVO ED INVIO DEI MATERIALI AL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA CLINICA

4.1 Norme generali

- contrassegnare tutti i campioni riportando sul contenitore il cognome ed il nome del paziente, la data di esecuzione del prelievo, la sede del prelievo;
- compilare accuratamente il modulo di richiesta;
- procedere alla raccolta del campione in campo sterile e, comunque, rispettando rigorosamente le norme di asepsi;
- raccomandare l'invio del materiale al Laboratorio di Microbiologia Clinica nel più breve tempo possibile: in attesa dell'inoltro del campione, provvedere alla sua conservazione in frigorifero (per i campioni di 'osso') oppure a temperatura ambiente (emocoltura), per non più di diciotto ore.
- nel caso in cui l'osso sia conservato con modalità diverse dalla crioconservazione, è necessario effettuare tutte le prove per la valutazione di sterilità anche al momento dell'utilizzo dell'osso.

4.2 Procedure

4.2.1 Materiali biologici

E' possibile utilizzare, per la valutazione della sterilità del tessuto osseo da utilizzare per l'alloinnesto:

- 1- la **biopsia** della spongiosa del tessuto osseo prelevato:
 - a. da un donatore vivente, allogenico od autologo
 - b. da un donatore cadavere;
- 2- il **tampone** cumulativo della superficie esterna, del periostio, della cartilagine e del canale midollare del tessuto osseo, se presenti nel tessuto prelevato.

Si descrivono inoltre le procedure operative nella fase di prelievo:

- 1- in fase di prelievo del tessuto osseo e di allestimento degli alloinnesti;

Non si considerano accettabili procedure che comportino il travaso dei frammenti ossei dall'eventuale liquido di conservazione (operazione effettuata in Sala Operatoria da parte del Chirurgo) negli opportuni brodi di coltura (manovra eseguita nel Laboratorio di Microbiologia Clinica da parte del Microbiologo) dato il rischio rilevante di possibile contaminazione esogena.

L'operatore deve eseguire la fase preanalitica di prelievo dei campioni biologici in asepsi, indossando guanti sterili, in campo sterile, immediatamente dopo il prelievo dell'osso: eventuali ritardi dovuti allo stazionamento 'a secco' dell'osso prelevato possono interferire con la vitalità dei microorganismi presenti *ab inizio* sull'osso e/o possono essere causa di contaminazione con germi ambientali, determinando risultati falsamente negativi o positivi, rispettivamente.

A. Biopsia di tessuto osseo (fase di prelievo del tessuto osseo):

1. prelevare il tessuto osseo secondo le procedure chirurgiche consuete;
2. nel caso di prelievo da donatore cadavere: pulire il tessuto osseo meccanicamente;
3. rimuovere il midollo con *curettage*;
4. procedere immediatamente alla resezione di tre frammenti di spongiosa midollare (orientativamente di 15 mm³), frammentandoli meccanicamente;

5. riporli nelle 3 provette contenenti brodi nutritivi (paragrafo 3.2). Le provette saranno conservate prima dell'uso presso la Sala Operatoria, alla temperatura di + 15-20° C o ad altra temperatura indicata dalla Casa produttrice dei terreni.
6. inviare, al termine dell'intervento chirurgico e comunque non oltre le 6 ore dal prelievo, le tre provette al Laboratorio di Microbiologia Clinica.

B. Tampone dell'osso (fase di prelievo del tessuto osseo):

A conclusione delle operazioni sopra descritte al punto A, procedere sulla base della disponibilità nel tessuto osseo prelevato come di seguito indicato, utilizzando il doppio tampone (paragrafo 3.2) :

1. inumidire i due tamponi in soluzione fisiologica sterile;
2. ruotare il primo tampone lungo la superficie craniale dell'osso (ad esempio: la superficie articolare della testa del femore), lungo la superficie inferiore dell'osso, e lungo il canale midollare dell'osso;
3. inserire il tampone nell'apposito terreno di trasporto;
4. ruotare il secondo tampone lungo la superficie craniale dell'osso (ad esempio: la superficie articolare della testa del femore), lungo la superficie inferiore dell'osso e lungo il canale midollare dell'osso;
5. inserire il tampone nell'apposito terreno di trasporto;
6. identificare i due tamponi con la definizione della sede di prelievo;
7. inviare i due tamponi, in un'unica busta, al Laboratorio di Microbiologia Clinica;
8. proseguire nella confezione dell'osso come da indicazione della 'Banca Regionale Tessuto Muscolo-Scheletrico' e:
 - riporre il tessuto osseo in un sacchetto sterile di plastica, a chiusura ermetica;
 - riporre il tessuto osseo così conservato in un secondo sacchetto sterile ed infine nel contenitore di plastica, a bocca larga e a con tappo a vite;
 - inviare alla 'Banca Regionale Tessuto Muscolo-Scheletrico' secondo le procedure consuete.

4.2.2 Sangue per emocoltura (solo nel donatore cadavere)

Il prelievo da donatore cadavere deve essere effettuato come di seguito indicato:

1. individuare il sito di prelievo;
2. lavare accuratamente le mani con acqua e sapone;
3. disinfettare la cute con clorexidina 0.5%, lasciando in sede di prelievo l'impacco antisettico per almeno 1 minuto;
4. rimuovere il cappuccio dai flaconi per emocoltura (per aerobi e per anaerobi), e disinfettarne il tappo di gomma applicandovi, per almeno un minuto, un impacco dello stesso antisettico utilizzato per la disinfezione della cute;
5. procedere al prelievo ematico da puntura cardiaca utilizzando un ago da 20 Gauge;
6. procedere all'inoculazione dei flaconi, con l'avvertenza di collegare al set di prelievo dapprima il flacone con brodo di coltura per batteri anaerobi e successivamente per aerobi.

5. INDAGINI MICROBIOLOGICHE

5.1 Premesse

All'arrivo presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica deve essere verificata la correttezza della fase pre-analitica (raccolta, conservazione ed invio del materiale) **compiando la parte finale del modulo di richiesta. (MOD/17 PS BO/01)**

Le indagini microbiologiche sono rivolte alla ricerca di batteri 'non esigenti', di batteri anaerobi e di miceti.

Per garantire la maggiore semplicità operativa e per minimizzare il rischio di contaminazione in laboratorio si considera la possibilità di procedere, presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica, alla processazione dei brodi di coltura, precedentemente inoculati in Sala Operatoria con i frammenti ossei senza necessità di omogeneizzare i tessuti seminandone poi l'omogenato.

5.2 Coltura dei tessuti ossei

5.2.1. Premessa

La coltura dei frammenti ossei è finalizzata alla verifica di sterilità di un materiale biologico utilizzabile per l'impianto. La corretta interpretazione del risultato colturale comporta lo scrupoloso rispetto della procedura operativa.

5.2.2. Fase operativa

A. Verifica di idoneità e primo trattamento del campione

Il materiale perviene direttamente al Laboratorio di Microbiologia Clinica dalla Sala Operatoria, dove il personale addetto ha provveduto ad inoculare i tre frammenti in altrettante provette contenenti i tre brodi di seguito indicati.

Compito del personale del Laboratorio di Microbiologia Clinica è quello di verificare la correttezza dell'invio, di procedere all'incubazione dei materiali e, in caso di sospetta positività e, comunque, a conclusione del periodo di incubazione di operare in cabina a flusso laminare procedendo alla loro semina in piastra.

a. Processazione dei campioni

- 1- incubare le provette di brodo **Cuore-Cervello** e di brodo **Sabouraud** in atmosfera **aerobia per sette giorni;**
 - 2- incubare le provette di brodo **Schaedler** in atmosfera **anerobia per sette giorni;**
 - 3- osservare quotidianamente le provette contenenti i tre brodi e procedere poi come di seguito indicato:
- A- in caso di intorbidamento macroscopico o di rilevazione di flocculazioni in una delle provette:
- a- agitare per dieci secondi, su **vortex**, la provetta contenente il brodo di coltura del frammento osseo sospettato di positività;
 - b- aprire le provette, operando in cabina a flusso laminare;
 - c- allestire un preparato microscopico (colorazione sec. Gram) dal brodo;
 - d- prelevare, in cabina a flusso laminare, con ansa sterile da 10 µl, il brodo da ognuna delle provette con segni di torbidità;
 - e- procedere a sottocoltura inoculando, in cabina a flusso laminare, i terreni di seguito indicati su un terzo della superficie della piastra, utilizzando la medesima

ansa sterile da 10 µl, e stendendo poi il materiale allo scopo di ottenere colonie isolate:

- α da brodo per aerobi (brodo Cuore-Cervello):
 - α 1- insemnzare una piastra di *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);
 - incubare a 35°C in atmosfera aerobia per 72 ore;
 - α 2- insemnzare una piastra di *Agar* cioccolato;
 - incubare a 35°C in atmosfera arricchita in CO₂ 5% per 72 ore;
- β- da brodo per anaerobi (brodo *Schaedler*):
 - β 1- insemnzare una piastra di *Agar Schaedler*;
 - incubare a 35° C in atmosfera anaerobia per 7 giorni;
- γ da brodo per miceti (brodo *Sabouraud*):
 - γ 1- insemnzare una piastra di *Sabouraud Dextrose Agar*;
 - incubare a 30° C in atmosfera aerobia oppure a temperatura ambiente per 7 giorni;

f- conservare le provette a temperatura ambiente fino alla conclusione dell'esame colturale

B- in caso di mancato intorbidamento macroscopico o di assenza di flocculazioni in ognuna delle tre provette, procedere - al termine del periodo di incubazione previsto - come precedentemente indicato, evitando tuttavia l'allestimento del preparato microscopico sec. Gram.

B. Lettura del preparato microscopico

1- in caso di positività, registrare la descrizione dei morfotipi evidenziati (senza riportare il risultato sul modulo di risposta, ma provvedendo ad effettuare una segnalazione preliminare (ad esempio: via fax) all'UO inviante di Ortopedia e, per conoscenza, alla 'Banca Regionale Tessuto Muscolo-Scheletrico').

C. Lettura delle piastre

- 1- in caso di positività, procedere all'identificazione del microorganismo;
- 2- registrare la carica microbica in modo semiquantitativo (senza riportare il risultato sul modulo di risposta);
- 3- non procedere all'effettuazione dei test di chemioantibioticosensibilità.

D. Conservazione degli stipti microbici

In sede locale, per decisione del singolo Centro, può essere opportuno procedere alla conservazione degli stipti microbici isolati in coltura. In questo caso è necessario:

- 1- conservare in congelatore a -80°C i ceppi isolati almeno fino alla conclusione del periodo di *follow-up* clinico, utilizzando le consuete modalità di preservazione in uso.

5.2.3. Interpretazione dei risultati

La diagnosi microbiologica di positività è effettuata in presenza dell'isolamento di microorganismi, indipendentemente dalla loro tipologia e dalla loro carica microbica:

- riportare nel referto la diagnosi microbiologica, senza specificarne la carica e senza effettuare i test di chemioantibioticosensibilità.

In caso di esame microbiologico negativo, riportare sul referto la dizione: 'Assenza di crescita batterica e fungina', secondo le modalità di refertazione abitualmente in uso localmente.

Il referto deve essere consegnato all'UO inviante di Traumatologia: sarà cura di questa trasmetterne copia alla 'Banca Regionale Tessuto Muscolo-Scheletrico'.

5.3 Coltura dei materiali raccolti con tampone

5.3.1. Premessa

La corretta interpretazione del risultato colturale comporta lo scrupoloso rispetto della procedura operativa. Appare fondamentale la verifica di idoneità del campione pervenuto al Laboratorio di Clinica: qualora il terreno di trasporto dei tamponi inviati nell'unico contenitore presenti segni di viraggio al viola della gelatina adsorbente l'ossigeno, sarà necessario procedere esclusivamente alla processazione di un solo campione (per la coltura di microrganismi aerobi e miceti) eliminando il secondo campione inizialmente destinato alla coltura per batteri anaerobi. In questo caso sarà necessario inviare all'UO inviante di Traumatologia la segnalazione scritta della non-processabilità del campione per germi anaerobi.

5.3.2. Fase operativa

A. Verifica di idoneità e primo trattamento del campione

Il materiale perviene al Laboratorio di Clinica dalla Sala Operatoria, dove il personale addetto ha provveduto ad inserire i due tamponi (prelevati a livello della superficie esterna superiore ed inferiore, e del canale midollare) in un unico terreno di trasporto. Compito del personale del Laboratorio di Microbiologia Clinica è quello di verificare la correttezza dell'invio, di procedere alla semina in piastra dei tamponi così pervenuti e di procedere all'incubazione in opportune atmosfere dei campioni pervenuti.

a. Terreni

- insemenzare il materiale sui seguenti terreni:

A. tampone n° 1:

- 1- una piastra di *Agar cioccolato*;
- 2- una piastra di *Sabouraud Dextrose Agar*,

B. tampone n° 2:

- 1-una piastra di *Agar Schaedler*.

b. Processazione dei campioni

1. ruotare il primo tampone sulla piastra di *Agar cioccolato* e di *Agar Sabouraud*, sull'area di un segmento circolare di circa un terzo della superficie del terreno su *Agar*;
2. strisciare, con ansa monouso da 1 µl, il materiale precedentemente deposto con tampone, fino ad ottenere serie di strisce ben separate;
3. incubare i materiali come di seguito indicato:
 - a- *Agar cioccolato* a 35 - 37° C in atmosfera arricchita con CO₂ 5% per 72 ore;
 - b- *Sabouraud Dextrose Agar* a 30°C in atmosfera aerobia oppure a temperatura ambiente per 7 giorni;
4. ruotare il secondo tampone sulla piastra di *Agar Schaedler*, sull'area di un segmento circolare di circa un terzo della superficie del terreno;

5. strisciare, con ansa monouso da 1µl, il materiale precedentemente deposto con tampone, fino ad ottenere serie di strisce ben separate;
6. incubare i materiali a 35 - 37° C in atmosfera anaerobia per 7 giorni;

B. Lettura delle piastre

- 1- in caso di positività, procedere all'identificazione del microorganismo;
- 2- registrare la carica microbica in modo semiquantitativo (senza riportare il risultato sul modulo di risposta);
- 1- in caso di positività, procedere all'identificazione del microorganismo;
- 2- registrare la carica microbica in modo semiquantitativo (senza riportare il risultato sul modulo di risposta);
- 3- non procedere all'effettuazione dei test di chemioantibioticosensibilità.

C. Conservazione degli stipiti microbici

In sede locale, per decisione del singolo Centro, può essere opportuno procedere alla conservazione degli stipiti microbici isolati in coltura. In questo caso è necessario:

- 1- conservare in congelatore a -80°C i ceppi isolati almeno fino alla conclusione del periodo di *follow-up* clinico, utilizzando le consuete modalità di preservazione in uso.

5.2.3. Interpretazione dei risultati

La diagnosi microbiologica di positività è effettuata in presenza dell'isolamento di microorganismi, indipendentemente dalla loro tipologia e dalla loro carica microbica:

- riportare nel referto la diagnosi microbiologica, senza specificarne la carica e senza effettuare i test di chemioantibioticosensibilità.

In caso di esame microbiologico negativo, riportare sul referto la dizione: 'Assenza di crescita batterica e fungina', secondo le modalità di refertazione abitualmente in uso localmente.

Il referto deve essere consegnato all'UO inviante di Traumatologia: sarà cura di questa trasmetterne copia alla 'Banca Regionale Tessuto Muscolo-Scheletrico'.

6. COMMENTO DEI RISULTATI

Pare opportuno completare il referto con una nota di commento in cui venga indicato che le indagini microbiologiche sono state effettuate in ottemperanza a quanto indicato nel presente protocollo e che compendino il giudizio finale di processabilità del tessuto osseo su base microbiologica.

Codifica	Indicazioni	
Nota 1	In tutti i casi di esecuzione delle prove di valutazione microbiologica	Si segnala che il campione è stato processato in accordo con il protocollo operativo 'Consensus sull'iter diagnostico microbiologico per l'accertamento dell'idoneità all'impianto di tessuti ossei' (referenza di letteratura, 2004)