# Diagnostica di laboratorio in microbiologia

Dal campione al risultato: metodi, qualità e due percorsi clinici su Salmonella

**Il risultato è utile solo se risponde alla domanda clinica.**



# Che cosa deve fare il laboratorio?

Una positività va sempre interpretata alla luce del paziente e della sede di prelievo.

## Identificare

Riconoscere il microrganismo o un suo marcatore in un campione pertinente.

## Orientare

Fornire informazioni utili alla scelta terapeutica, compresa la sensibilità agli antimicrobici quando indicata.

## Sorvegliare

Contribuire a riconoscere focolai e resistenze attraverso la caratterizzazione degli isolati.

# Il percorso diagnostico

## Tre fasi, una sola catena di qualità

- Preanalitica: domanda, scelta del campione, raccolta, identificazione e trasporto.
- Analitica: preparazione, ricerca del patogeno, identificazione e controlli.
- Postanalitica: validazione, referto, comunicazione dei risultati critici e interpretazione.

**Un errore prima dell’analisi può rendere poco utile anche un test eseguito correttamente.**

# La fase analitica: quali tecniche?

Metodo e materiale vanno scelti in base alla sindrome e alla domanda clinica.

## Microscopia

Osservazione diretta e colorazione di Gram: indica morfologia e prima classificazione; non dà sempre una specie.

## Coltura

Fa crescere il microrganismo, consente isolamento, identificazione, tipizzazione e antibiogramma; richiede vitalità e tempo.

## Metodi molecolari

PCR/NAAT e pannelli: identificano acidi nucleici con tempi spesso più brevi; non forniscono necessariamente un isolato.

# Dal segnale al referto

Una prima segnalazione può precedere la caratterizzazione definitiva.

## Identificazione e sensibilità

Dopo una coltura positiva: isolamento; identificazione con metodi biochimici, MALDI-TOF o molecolari; eventuale AST secondo indicazione clinica.

## Interpretazione

Rilevare DNA, antigene o crescita non equivale sempre a dimostrare infezione. Valutare flora commensale, colonizzazione, contaminazione e quadro clinico.

# Falsi positivi e falsi negativi

Un risultato negativo riduce la probabilità di malattia in misura variabile: conta il contesto.

## Falso positivo

Contaminazione durante il prelievo, reazione aspecifica o colonizzazione interpretata come infezione possono portare a trattamenti inutili.

## Falso negativo

Prelievo nel sito o momento errato, volume insufficiente, antibiotici già assunti o trasporto inadeguato possono impedire la rilevazione.

# Sensibilità, specificità e probabilità pre-test

Il test non sostituisce una richiesta clinica ben formulata.

## Come si valuta un test

Sensibilità: capacità di rilevare i casi presenti.
Specificità: capacità di risultare negativo nei soggetti senza la condizione cercata.

## Come si usa il risultato

Sindrome, esposizioni e prevalenza determinano la probabilità prima del test. Il valore di un positivo o negativo cambia con questa probabilità.

# Controlli di qualità: cosa verificano?

I controlli verificano il sistema analitico, non compensano un campione raccolto male.

## Controllo positivo

Deve produrre il segnale atteso. Se fallisce, un risultato negativo del paziente non è affidabile: occorre cercare il guasto e ripetere secondo procedura.

## Controllo negativo

Deve restare negativo. Se diventa positivo, sospettare contaminazione o segnale aspecifico; i risultati della seduta richiedono verifica.

# Controlli: tre domande diverse

Controllo di seduta e controllo interno rispondono a problemi differenti.

## Positivo di seduta

Il bersaglio noto viene rilevato? Verifica che reagenti e procedura siano in grado di produrre il segnale atteso.

## Negativo di seduta

Il bersaglio è assente dove deve esserlo? Un segnale inatteso fa indagare contaminazione o reazioni aspecifiche.

## Interno al campione

Nei test molecolari: estrazione e amplificazione sono riuscite? L’inibizione può rendere non interpretabile un “negativo”.

# Quando un controllo fallisce

Anche un controllo interno inibito impone una verifica del singolo campione: “non rilevato” non significa “test valido”.

## Positivo negativo → rischio di falsi negativi

Non validare i risultati interessati. Verificare reagenti, strumento e procedura; correggere la causa e ripetere i test secondo protocollo.

## Negativo positivo → rischio di falsi positivi

Non refertare come validi i risultati interessati. Valutare contaminazione, reagenti e passaggi condivisi; ripetere i test secondo protocollo.

# Prima del prelievo: una richiesta utile

## Il laboratorio deve sapere che cosa si cerca

- Sede anatomica esatta e tipo di campione; sindrome e ipotesi diagnostica.
- Data e ora del prelievo, terapia antimicrobica già iniziata, eventuale urgenza.
- Viaggio, alimento condiviso, contatto o altro dato epidemiologico se pertinente.

**“Ricerca Salmonella” in diarrea e “sospetta febbre tifoide” richiedono strategie diverse.**

# Accettazione del campione

In caso di non conformità: documentare, contattare il richiedente e applicare la procedura del laboratorio.

## Identità

Identificativi concordanti tra contenitore e richiesta; registrare sede e orario.

## Materiale

Contenitore e terreno di trasporto appropriati; quantità adeguata alla metodica.

## Integrità

Assenza di perdite, condizioni di conservazione e tempo di trasporto compatibili.

# Preparare il paziente alla raccolta

Esempio: per urinocoltura si richiede il mitto intermedio, non la prima urina per ogni indagine.

## Istruzioni pratiche

Spiegare contenitore, igiene delle mani, procedura passo per passo, etichetta e consegna. Verificare che il paziente abbia capito.

## Perché conta

Un campione contaminato o insufficiente può generare risultati fuorvianti e richiedere un nuovo prelievo. Restrizioni e tempi sono specifici del test.

# Campioni comuni: scegli la sede giusta

Raccogliere prima degli antimicrobici quando possibile, senza ritardare cure urgenti.

## Urine

Urinocoltura: mitto intermedio in contenitore sterile; da catetere usare il punto di campionamento, mai la sacca.

## Vie respiratorie

Espettorato da tosse profonda, non saliva; tampone faringeo e nasofaringeo rispondono a quesiti diversi.

## Cute e ferite

Preferire tessuto o aspirato dalla sede rilevante quando fattibile; un tampone superficiale può riflettere colonizzazione.

# Feci: raccolta e analisi

La presenza di un isolato permette sierotipizzazione, AST se indicato e indagini di focolaio.

## Campione

Feci fresche in contenitore idoneo, senza urina o acqua. Se il trasporto è ritardato, seguire tempi e terreno prescritti dal laboratorio.

## Strategia

Per gastroenterite: coltura mirata o pannello molecolare secondo indicazione. Dopo una PCR positiva, la coltura può servire per ottenere l’isolato.

# Salmonella: due sindromi, due percorsi

La distinzione originale tra sierotipi tifoidei e non tifoidei guida la scelta del campione.

## Tifoide: S. Typhi

Serbatoio umano; trasmissione fecale orale. Febbre persistente e malattia sistemica: la batteriemia rende centrale l'emocoltura.

## Non tifoidee: es. Enteritidis

Spesso associate ad alimenti e animali. Gastroenterite con diarrea e crampi: il campione iniziale è di norma fecale.

**Stessa specie, diversa probabilità di trovare il patogeno in sangue o feci.**

# Emocolture: raccolta e risposta

Per sospetta febbre tifoide, specificare il viaggio e l’ipotesi clinica nella richiesta.

## Prelievo

Set e volume adeguati secondo protocollo; antisettico cutaneo e tappo del flacone; prima degli antibiotici se fattibile. Non aspettare un picco febbrile.

## Dopo la positività

Il sistema segnala crescita. Gram informa subito (es. bacilli Gram negativi); identificazione e antibiogramma richiedono ulteriori passaggi.

# Che cosa c’è in un flacone per emocoltura?

Brodo nutritivo per la crescita.

Flaconi aerobi e anaerobi secondo protocollo; formulazioni pediatriche per piccoli volumi.

Alcuni contengono resine che riducono l’effetto degli antimicrobici. I sistemi automatici rilevano segnali di crescita.



# Trasporto e conservazione

Una regola unica di refrigerazione per tutti i campioni porta a errori.

## Regola generale

Contenitore chiuso ed etichettato; imballaggio secondario, consegna rapida e tracciabilità. Terreno, temperatura e durata dipendono da campione e test.

## Eccezioni decisive

Urine non conservate: processare prontamente o usare refrigerazione/preservante indicato. Flaconi di emocoltura: inviare rapidamente a temperatura ambiente; non refrigerare.

# Il referto chiude il percorso

## Il laboratorio comunica ciò che sa, quando lo sa

- Verifica tecnica dei risultati e comunicazione tempestiva delle positività rilevanti.
- Referto preliminare: osservazione o segnale attendibile, con limiti espliciti.
- Referto finale: identificazione, eventuale sensibilità e commento interpretativo.

**Il clinico integra il referto con sintomi, sede, epidemiologia e trattamento.**

# Salmonella: dal contagio alla sindrome

La sede in cui cercare il batterio dipende dalla sindrome, non soltanto dal nome “Salmonella”.

## S. enterica: molti sierotipi

La classificazione distingue sierotipi tifoidei (Typhi e Paratyphi) e non tifoidei (es. Enteritidis). La distinzione ha conseguenze cliniche e diagnostiche.

## Tifo e paratifo

Serbatoio umano, trasmissione fecale orale da acqua o alimenti contaminati. Febbre persistente e infezione sistemica; la diarrea può mancare.

## Gastroenterite non tifoidea

Esposizione alimentare, spesso da serbatoi animali. Diarrea, febbre e crampi; possibile batteriemia nei casi invasivi o in persone vulnerabili.

# Salmonella: campione, tecnica, interpretazione

Prima di interpretare PCR o coltura, verificare i controlli del test, la qualità del campione e la fase della malattia.

## Febbre sistemica dopo viaggio

Emocolture precoci e prima degli antibiotici se possibile; volume adeguato. Nella prima settimana la coprocoltura può essere negativa: non esclude il tifo.

## Diarrea dopo alimento comune

Feci fresche per coltura o pannello molecolare validato. La PCR rileva Salmonella spp. ma può non identificare il sierotipo; la coltura recupera l'isolato.

## Che cosa aggiunge l'isolato

Identificazione e sierotipizzazione; AST quando indicato; confronto tra isolati per indagare un focolaio. La sierologia per tifo non sostituisce l'emocoltura.

# Lavoro di gruppo · Salmonella in laboratorio

8 minuti di discussione • 1 minuto a gruppo per riferire • discussione comune sulle due diagnosi.

## Gruppi 1 e 2 · sospetto tifo

1: raccolta e risultato negativo precoce.

2: emocoltura positiva e comunicazione del risultato.

## Gruppi 3 e 4 · gastroenterite

3: scelta del campione, PCR e controlli.

4: isolato, trattamento e possibile focolaio.

# Gruppo 1 · Tifo: quale campione e quando?

**DATI DEL CASO**

24 anni, rientro dall'Asia meridionale; febbre persistente da 5 giorni, cefalea e dolore addominale, senza diarrea. Nessun antibiotico. Feci del giorno 5: coltura negativa.

**DISCUTETE E MOTIVATE**

1. Quale campione deve avere priorità? Come lo raccogli?
2. La coprocoltura negativa esclude il tifo? Spiega il ruolo del tempo.
3. Indica due fattori preanalitici che possono ridurre la resa.

**CONSEGNA · Proponete campione, tempistica e interpretazione del negativo.**

# Gruppo 2 · Tifo: dal flacone positivo al referto

**DATI DEL CASO**

Stesso paziente del gruppo 1. Un flacone per emocoltura segnala positività; Gram: bacilli Gram negativi. In seguito: Salmonella enterica sierotipo Typhi; AST in corso.

**DISCUTETE E MOTIVATE**

1. Che cosa comunichi subito e che cosa non puoi ancora affermare?
2. Che cosa aggiunge l’identificazione del sierotipo?
3. Quali verifiche di qualità precedono la validazione del referto?

**CONSEGNA · Preparate un referto preliminare e una conclusione finale.**

# Gruppo 3 · Gastroenterite: PCR e controlli

**DATI DEL CASO**

22 anni, diarrea, crampi e febbre dopo un pasto condiviso. Due amici hanno gli stessi sintomi. PCR fecale: Salmonella spp.; controlli di seduta e interno validi.

**DISCUTETE E MOTIVATE**

1. Quale campione raccogli e perché non parti dalle emocolture?
2. Che cosa dice la PCR e che cosa non identifica?
3. Che cosa cambierebbe se il controllo negativo o interno fallisse?

**CONSEGNA · Motivate test iniziale, validità del risultato e passaggio successivo.**

# Gruppo 4 · Gastroenterite: isolato e focolaio

**DATI DEL CASO**

Stesso pasto del gruppo 3. La coltura fecale isola S. enterica sierotipo Enteritidis; la paziente migliora, ma altri partecipanti sono ancora sintomatici.

**DISCUTETE E MOTIVATE**

1. È una salmonellosi tifoidea o non tifoidea? Quale quadro sostiene?
2. A che cosa serve conservare e caratterizzare l'isolato?
3. La positività implica sempre antibiotici? Quali fattori contano?

**CONSEGNA · Formulate conclusione clinica e utilità per l'indagine del focolaio.**

# Discussione comune · caso di febbre tifoide

Domanda per tutti: come cambierebbe la strategia se il paziente avesse già iniziato antibiotici?

## Gruppo 1 · preanalitica

Emocolture precoci, volume e asepsi adeguati, idealmente prima degli antibiotici. Feci negative nella prima settimana non escludono il tifo.

## Gruppo 2 · analitica e referto

Gram: segnalare solo bacilli Gram negativi. Dopo identificazione: Typhi isolata dal sangue conferma l’infezione. Verificare controlli tecnici di identificazione e AST prima del referto finale.

# Discussione comune · caso di gastroenterite

Domanda per tutti: che cosa aggiunge la coltura se la PCR è già positiva?

## Gruppo 3 · PCR e controlli

Feci per test enterici. Controlli validi rendono interpretabile il risultato; se falliscono, non validarlo. PCR Salmonella spp. non equivale a un sierotipo o a un isolato.

## Gruppo 4 · coltura e decisione

Enteritidis è non tifoidea. Conservare l’isolato per caratterizzazione e confronto nel focolaio. Nella forma non complicata la terapia è spesso di supporto.

# Confronto finale: stessa specie, scelte diverse

Domanda clinica → sede e tempo del prelievo → tecnica → interpretazione.

## Sospetto tifo

Febbre sistemica + viaggio → sangue prioritario → isolamento di Typhi; feci negative precoci non escludono.

## Gastroenterite

Diarrea + alimento comune → feci prioritarie → PCR e/o coltura; isolato utile per caratterizzazione del focolaio.

# Da ricordare

## Cinque domande davanti a ogni risultato

- Quale sindrome e quale esposizione motivano il test?
- Campione, sede e tempo di prelievo sono corretti?
- La tecnica misura crescita, antigene o materiale genetico?
- I controlli sono validi e quali limiti ha il risultato?

**La quinta domanda: quale decisione cambia per il paziente o per la sanità pubblica?**

# Fonti essenziali

Immagini di Salmonella e flaconi riprese dalle slide originali della docente.

## Pratica diagnostica

IDSA/ASM. Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory, aggiornamento 2024.

WHO. Laboratory quality management system: handbook, 2011.

## Salmonella

CDC. Clinical Guidance for Typhoid and Paratyphoid Fever.

CDC Yellow Book. Typhoid and Paratyphoid Fever.

CDC. Clinical Overview of Salmonellosis.