

Utilità del microcampionamento broncoscopico per l'identificazione di batteri patogeni nelle infezioni respiratorie*

Mari Sasabayashi, MD; Yoshitaka Yamazaki, MD, PhD;
Kenji Tsushima, MD, PhD; Orié Hatayama, MD; Tadashi Okabe, MD

Premessa: Il microcampionamento broncoscopico (MCB) è una metodica in cui un dispositivo costituito da un filo metallico con all'estremità una sonda di poliestere è utilizzato per raccogliere il liquido che ricopre l'epitelio bronchiale durante la broncoscopia. In questo studio abbiamo valutato una metodica di campionamento per l'analisi batteriologica, l'MCB, per includerla nella diagnostica delle infezioni respiratorie.

Metodi: Per gli esperimenti sono stati utilizzati ceppi di *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium avium* complex (MAC). Nella procedura di campionamento standard che utilizza l'MCB, la sonda fuoriuscita dalla guaina veniva immersa in una sospensione batterica di circa 6×10^6 ufc/mL per 30 secondi e riversata in una provetta contenente 1 mL di normale soluzione salina. La provetta veniva agitata tramite una turbina per circa 1 minuto. La quota di campionamento è stata calcolata mediante la seguente equazione: quantità effettiva di batteri raccolta tramite MCB (unità formanti colonia per mL)/quantità di batteri presenti in sospensione per campionamento (unità formanti colonie per mL) x 100 (percentuale).

Risultati: Il tasso di campionamento per *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e MAC non ha evidenziato differenze significative per i tre batteri tranne per lo *Pseudomonas aeruginosa*, che è stato più alto. Il breve tempo di campionamento, l'agitamento prodotta e la ridotta quota batterica presente in sospensione (1/100) non hanno alterato la resa della procedura standard. Al contrario, il recupero dello *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e MAC con il sistema dello spazzolamento protetto (SSP) era significativamente più basso rispetto a quello effettuato con MCB ma il recupero dello *Pseudomonas aeruginosa* non presentava differenze.

Conclusioni: Questo studio *in vitro* potrebbe suggerire l'utilità dell'MCB come nuova tecnica diagnostica in grado di fornire campionamenti stabili e quantitativi.

(CHEST Edizione Italiana 2007; 2:16-21)

Parole chiave: BAL; liquido che ricopre l'epitelio bronchiale; microcampionamento broncoscopico; sistema dello spazzolamento protetto

Abbreviazioni: MCB = microcampionamento broncoscopico; LRE = liquido che ricopre l'epitelio; MAC = *Mycobacterium avium* complex; SSP = sistema dello spazzolamento protetto; PAV = polmoniti associate alla ventilazione

I test batteriologici come l'esame colturale dell'espettorato e dello striscio sono particolarmente importanti per la diagnosi delle polmoniti batteriche fra le infezioni delle vie respiratorie. Invece, per i pazienti con specifiche condizioni patologiche come le polmoniti gravi e quelle associate alla ventilazione (PAV), è raccomandato l'utilizzo dell'identificazione broncoscopica del germe patogeno.¹⁻⁵ Il BAL, utiliz-

zato per questo test, viene preparato tramite la somministrazione, attraverso il broncoscopio, di 50-150 mL di normale soluzione fisiologica successivamente recuperata per l'analisi batteriologica. I batteri vengono raccolti tramite il lavaggio bronchiale, ma frequentemente il campione risulta essere contaminato dalla flora microbica orale locale. Nella diagnosi di PAV sono utilizzati criteri diagnostici basati sulla

quota batterica sono utilizzati per escludere la flora microbica orale e cutanea locale. I batteri presenti in concentrazioni $\geq 1 \times 10^3$ ufc/mL in un campione prelevato con il sistema dello spazzolamento protetto (SSP) e/o $\geq 1 \times 10^4$ nel BAL sono considerati patogeni. Il fatto che il livello richiesto per la diagnosi nel BAL sia di un ordine più alto suggerisce la maggiore utilità dell'SSP.^{2,6}

Sono stati effettuati diversi studi⁴⁻⁷ sull'utilità dell'SSP per la diagnosi di PAV. Le caratteristiche dello strumento sono le seguenti: (1) la spazzola per il prelievo è ricoperta da una guaina e (2) l'estremità della guaina è chiusa; questo riduce la contaminazione da parte di batteri della flora microbica locale anche se la spazzola è inserita attraverso il canale per le pinze di un broncoscopio. Il sistema di microcampionamento broncoscopico (MCB) è ricoperto da una guaina non chiusa.

Poiché l'SSP è in grado di raccogliere il materiale purulento dalle lesioni attraverso l'utilizzo della spazzola sotto guida broncoscopica, è possibile incrementare la quota di batteri raccolti nei casi clinici.⁷ Wimberly e coll.⁷ hanno evidenziato che le determinazioni di peso tramite SSP prima e dopo basate su colture quantitative indicava che la spazzola accumula approssimativamente 0,001 mL (1 μ L) di campione. È possibile che la spazzola possa accumulare differenti quantità di secrezioni purulente. Comunque, anche una variazione di 10 volte nelle dimensioni del campione determinerebbe una differenza di 1 unità log con il conteggio batterico quantitativo.

L'MCB è una nuova procedura per la diagnosi broncoscopica, capace di raccogliere il liquido che ricopre l'epitelio bronchiale (LRE).⁸⁻¹⁰ Una sonda in polietilene-assorbibile di 30 mm di lunghezza, 1,1 mm di larghezza è collegata ad una estremità metallica e racchiusa in una guaina guida di plastica (Figura 1). L'MCB viene eseguito durante l'osservazione del lume bronchiale tramite l'utilizzo di un fibroscopio; quando viene raggiunta la zona di interesse la

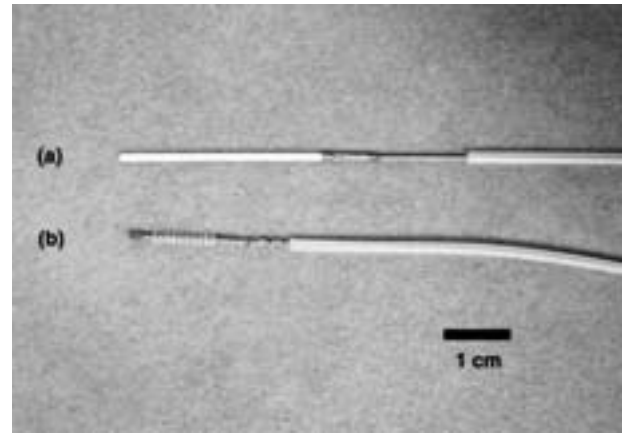


FIGURA 1. Una sonda per il microcampionamento in polietilene assorbibile (30 mm di lunghezza e 1,1 mm di larghezza) è collegata ad un'estremità metallica (estremità, a). L'SSB, il sistema dello spazzolamento protetto, è costituito da una spazzola racchiusa in una guaina guida (in basso, b).

sonda viene estratta dalla guaina con assorbimento del liquido presente nel lume bronchiale. Ishizaka e coll.⁸⁻¹⁰ hanno analizzato varie citochine in pazienti con ARDS utilizzando questo metodo, ed hanno riscontrato che l'MCB era utile quanto il BAL in termini di efficacia e minor invasività nel prelievo di LRE.

In questo studio, abbiamo valutato da un punto di vista batteriologico la possibilità di applicare l'MCB nella diagnostica delle infezioni respiratorie, ponendo attenzione a due vantaggi dell'MCB: (1) effettivo assorbimento di LRE e (2) minore invasività per il paziente. Abbiamo eseguito uno studio batteriologico di base tramite il microcampionamento di forme batteriche tipiche coinvolte nell'eziologia della polmonite acquisita in comunità: *Streptococcus pneumoniae*; *Haemophilus influenzae*;¹¹⁻¹³ *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente coinvolto nelle polmoniti ospedaliere;¹⁴⁻¹⁶ il *Mycobacterium avium* complex (MAC), che è stato recentemente riscontrato in donne di mezza età.^{17,18}

*Dai Departments of Pulmonary and Infectious Diseases (Drs. Sasabayashi, Tsushima and Hatayama), Endoscopy (Dr. Yamazaki), and Laboratory Medicine (Dr. Okabe), Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan.

Dr. Yamazaki è stato parzialmente sostenuto da una ricerca promossa dalla Japanese Foundation for Research and Promotion of Endoscopy (2006). Gli altri autori non hanno conflitti di interesse da dichiarare.

Manoscritto ricevuto il 18 aprile 2006; revisione accettata il 31 agosto 2006.

La riproduzione di questo articolo è vietata in assenza di autorizzazione scritta dell'American College of Chest Physicians (www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml).

Corrispondenza: Yoshitaka Yamazaki, MD, PhD, Department of Endoscopy, Shinshu University School of Medicine, Asahi, Matsumoto, 390-8621, Japan.

(CHEST 2007; 131:474-479)

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e colture

I ceppi batterici utilizzati erano *S pneumoniae* (IID553 [NYSHDHP-2]), *H influenzae* (ATCC9833), *P aeruginosa* (ATCC27107) e MAC (ceppo 104) (fornito dal Dr. L.E. Bermudez, Oregon State University). I batteri conservati a -78°C venivano scongelati; *S pneumoniae* e *P aeruginosa* venivano coltivati su una piastra di agar-sangue (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ), *H influenzae* su una piastra di agar cioccolato (Becton Dickinson) e il MAC sul Middlebrook 7H11 medio (Becton Dickinson) a 37°C con il 5% di CO_2 . *S pneumoniae* e *P aeruginosa* sono stati messi in coltura tutta la notte e poi utilizzati. Il MAC è stato messo in coltura per 10 giorni e poi utilizzato.

Preparazione della sospensione batterica

S pneumoniae, *H influenzae*, *P aeruginosa* e MAC sono stati raccolti tramite un tampone di cotone e posti in sospensione in una provetta di plastica contenente una normale soluzione fisiologica. La torbidità è stata regolata utilizzando una soluzione fisiologica e il McF assay meter (bioMerieux; Marcy l'Etoile, Francia) e la concentrazione della sospensione batterica per il campionamento è stata corretta approssimativamente a 6×10^6 ufc/mL. La sospensione (2 mL) è stata aggiunta a una provetta di plastica di 3 mL e 100 μ L sono stati raccolti utilizzando una pipetta e combinati con 900 μ L di soluzione fisiologica con diluizioni di 1/10; poi 100 mL di ogni diluizione sono stati inoculati ed omogeneamente distribuiti tramite uno stick di Conradi su una piastra di agar. Abbiamo posto particolare attenzione ai seguenti punti: (1) la sonda era completamente immersa in una sospensione batterica e (2) tutte le procedure sono state eseguite su un piano pulito per evitare contaminazioni.

Procedura standard

Una sonda (polietilene, 30 mm di lunghezza e 1,1 mm di diametro) posta alla punta di un sistema di microcampionamento (BC-401C; Olympus; Tokyo, Giappone) veniva estratta di 5 cm dalla guaina. La sonda veniva posta in una sospensione batterica, estratta dopo 30 sec. e richiamata nella guaina. La sonda era successivamente estratta dalla guaina e la porzione spugnosa tagliata con delle forbici disinfettate con etanolo. La sonda veniva successivamente immersa in una soluzione fisiologica presente in una provetta di Eppendorf. La provetta veniva successivamente agitata per 1 min. tramite un agitatore. Venivano preparate soluzioni seriate, inoculate su una piastra di agar con successivo conteggio delle colonie. La quota di campionamento batterico veniva calcolata utilizzando l'equazione seguente: quantità effettiva di batteri raccolta tramite MCB (unità formanti colonia per mL)/quantità di batteri presenti in sospensione per campionamento (unità formanti colonie per mL) \times 100 (percentuale).

Revisione dei parametri di studio

Campionamento e tempi di agitazione del campione: È stata analizzata la riduzione dei tempi di trattamento del campione con il metodo standard di MCB. La durata di immersione della sonda nella sospensione batterica per il campionamento è stata ridotta a 5 sec. (30 sec. con il metodo standard). Inoltre, i tempi di agitazione della sonda tramite agitatore dopo il campionamento batterico sono stati ridotti a 10 sec. (1 min. nel metodo standard).

Campionamento batterico: Per verificare se l'MCB era in grado di raccogliere stabilmente i batteri in presenza di modificazioni del campione, la sospensione batterica è stata sottoposta ad una diluizione di 1/100. Questa soluzione è stata sottoposta al conteggio delle colonie. Il tempo di campionamento era di 30 sec., l'agitamento del campione, le diluizioni seriate ed il conteggio delle colonie è stato eseguito attraverso procedure standard.

Tempi di attesa (conservazione): Poiché i campioni raccolti con l'MCB non possono essere analizzati immediatamente dopo il campionamento nell'applicazione clinica, è stata studiata la stabilità del campione batterico ottenuto per MCB durante il tempo di conservazione. Dopo il campionamento attraverso procedura standard, la sonda è stata conservata in una provetta di Eppendorf a temperatura ambiente per 3 h, con successiva agitazione, preparazione di diluizioni seriate e conteggio delle colonie tramite procedura standard.

Surfactante: È importante valutare una possibile inconsistenza della quota batterica legata a fenomeni di adesione batterica allo

strumento di campionamento, che riduce il numero effettivo di batteri. Una soluzione salina fisiologica contenente lo 0,1% di surfactante (Tween 80; Sigma; St. Louis, MO) è stata preparata per inibire i fenomeni di adesione batterica alla sonda e ai tubi. La soluzione di Tween (1mL) è stata aggiunta in una provetta di Eppendorf, preparata secondo procedure standard, agitata per 1 min. utilizzando un agitatore, seguita da preparazione di diluizioni seriate con soluzione di Tween e conteggio delle colonie.

Test con SSP

L'SSP è uno strumento con una spazzola ricoperta da una guaina chiusa distalmente costituita da glicerolo polietilenico. In questo studio, abbiamo utilizzato una spazzola con guaina (dispositivo per spazzolamento citologico BC-202D-2010; Olympus) immersa in una sospensione batterica per il campionamento (6×10^6 ufc/mL) per 30 sec. e conservata in una guaina. La spazzola è stata successivamente estratta dalla guaina, tagliata con forbici disinfettate con etanolo, conservata in una provetta di Eppendorf contenente 1mL di soluzione fisiologica. Dopo l'agitamento, sono state effettuate diluizioni seriate con conteggio delle colonie tramite procedura standard.

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte e sono state calcolate le medie con le DS. Per il confronto tra gruppi è stato utilizzato il test U di Mann-Whitney; sono stati considerati significativi i risultati con valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

Valutazione della procedura standard

La quota batterica presente in sospensione per campionamento era di $5,90 \pm 2,42 \times 10^5$ ufc/mL per lo *S pneumoniae*, $6,87 \pm 4,04 \times 10^6$ ufc/mL per *H influenzae*, $7,83 \pm 1,80 \times 10^6$ ufc/mL per *P aeruginosa* e $3,47 \pm 1,97 \times 10^6$ ufc/mL per il MAC. La quota batterica raccolta sulla sonda per MCB era di $9,10 \pm 4,19 \times 10^4$, $9,17 \pm 4,91 \times 10^4$, $23,7 \pm 8,62 \times 10^4$ e $4,27 \pm 3,57 \times 10^4$ ufc/mL, rispettivamente. Il tasso di campionamento era di $1,41 \pm 0,02\%$, $1,40 \pm 0,17\%$, $3,29 \pm 1,64\%$, e $1,22 \pm 0,53\%$, rispettivamente, in assenza di differenze significative per *S pneumoniae*, *H influenzae* e MAC; al contrario, il tasso di campionamento per *P aeruginosa* era significativamente più alto rispetto alle altre 3 specie batteriche ($p < 0,05$) [Tabella 1]. Le colonie che si formavano sulla piastra di agar sono state osservate con attenzione senza evidenza di contaminazione batterica o fungina.

MCB in varie condizioni

Tempi di campionamento: Il campionamento della durata di 5 sec. è stato confrontato con quello di 30 min. secondo procedura standard. Il tasso di campionamento per *S pneumoniae*, *H influenzae*, *P aeruginosa*, e MAC è stato di $1,46 \pm 0,22\%$, $1,65 \pm 0,34\%$, $3,32 \pm 0,90\%$, e $1,32 \pm 0,35\%$, rispettivamente, mo-

Tabella 1—Confronto tra il tasso di campionamento effettuato con procedura standard e con MCB modificato*

Variabili	Quota batterica		
	Campione reale, X10 ⁴ ufc/mL	Sospensione, X10 ⁶ ufc/mL	Tasso di campionamento, %
Campionamento standard			
<i>S pneumoniae</i>	5,90 ± 2,42	9,10 ± 4,19	1,41 ± 0,22†
<i>H influenzae</i>	6,87 ± 4,04	9,17 ± 4,91	1,40 ± 0,17†
<i>P aeruginosa</i>	7,83 ± 1,80	23,7 ± 8,62	3,29 ± 1,64
MAC	3,47 ± 1,97	4,27 ± 3,57	1,22 ± 0,53†
Tempo di campionamento breve 5 s			
<i>S pneumoniae</i>	4,40 ± 3,00	26,9 ± 35,0	1,46 ± 0,22†
<i>H influenzae</i>	3,40 ± 2,86	5,40 ± 3,96	1,65 ± 0,34†
<i>P aeruginosa</i>	6,30 ± 0,70	16,2 ± 12,7	3,32 ± 0,90
MAC	3,37 ± 3,67	1,40 ± 0,44	1,32 ± 0,35†
Trattamento con soluzione di Tween allo 0,1% SSTH			
<i>S pneumoniae</i>	4,37 ± 1,93	3,73 ± 1,93	1,94 ± 0,65†
<i>H influenzae</i>	3,73 ± 1,93	6,87 ± 4,45	1,79 ± 0,35†
<i>P aeruginosa</i>	7,63 ± 1,46	25,0 ± 13,7	4,64 ± 0,93
MAC	3,47 ± 1,97	5,77 ± 1,97	1,97 ± 0,82†
Conservazione per 3h in aria ambiente dopo campionamento			
<i>S pneumoniae</i>	9,57 ± 2,96	14,0 ± 2,00	1,55 ± 0,40†
<i>H influenzae</i>	4,13 ± 0,51	7,03 ± 5,19	1,63 ± 1,00
<i>P aeruginosa</i>	8,67 ± 1,27	30,3 ± 11,9	3,46 ± 1,03
MAC	1,70 ± 0,17	14,4 ± 22,2	1,46 ± 0,92†
Tempo di agitazione breve per 10 s. con agitatore			
<i>S pneumoniae</i>	6,83 ± 1,68	9,37 ± 3,15	1,47 ± 0,15†
<i>H influenzae</i>	3,10 ± 0,90	9,20 ± 7,00	2,70 ± 1,60‡
<i>P aeruginosa</i>	7,70 ± 1,57	24,0 ± 13,1	3,37 ± 2,25
MAC	1,37 ± 0,21	1,57 ± 0,91	1,37 ± 0,72

*I dati sono espressi come medie ± DS. SSTH = Soluzione salina tamponata di Hank.

†p < 0,05; il tasso di campionamento di *P aeruginosa* era significativamente più alto rispetto a quello di *S pneumoniae*, *H influenzae*, o MAC in ogni gruppo.

‡p < 0,05; i tassi di campionamento di ogni batterio erano più alti di quelli effettuati con campionamento standard.

strandando una significatività più alta per *P aeruginosa* (p < 0,05), ma nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra la durata di 5 sec. nel tasso di campionamento e i tempi standard.

Modificazioni per campionamento della quota batterica in sospensione: La valutazione è stata eseguita utilizzando una sospensione batterica con una diluizione di 1/100 per campionamento. La quota di

Tabella 2—Tasso di campionamento della soluzione batterica diluita utilizzando MCB*

Variabili	Quota batterica		
	Campione reale, X10 ⁴ ufc/mL	Sospensione, X10 ⁶ ufc/mL	Tasso di campionamento, %
Campionamento batterico diluito (1:100)			
<i>S pneumoniae</i>	5,57 ± 3,41	12,9 ± 8,15	2,40 ± 1,23
<i>H influenzae</i>	1,97 ± 0,42	7,37 ± 3,07	3,88 ± 1,80
<i>P aeruginosa</i>	4,17 ± 1,31	5,83 ± 0,80	1,86 ± 0,58
MAC	1,67 ± 0,60	1,23 ± 0,97	0,66 ± 0,32†

*I dati sono espressi come medie ± DS.

†p < 0,05; il tasso di campionamento di MAC era significativamente più basso rispetto a quello di altri batteri.

S pneumoniae, *H influenzae*, *P aeruginosa* e MAC nella diluizione era di 5,57 ± 3,41 x 10⁴, 1,97 ± 0,42 x 10⁴, 4,17 ± 1,31 x 10⁴, e 1,67 ± 0,60 x 10⁴ ufc/mL, rispettivamente. La quota batterica raccolta sulla sonda era di 12,9 ± 8,15 x 10², 7,37 ± 3,07 x 10², 5,83 ± 0,80 x 10², e 1,23 ± 0,97 x 10² ufc/mL, rispettivamente. Il tasso di campionamento era di 2,40 ± 1,23%, 3,88 ± 1,80%, 1,86 ± 0,58%, e 0,66 ± 0,32%, rispettivamente, in assenza di differenze statisticamente significative per le quattro specie batteriche (Tabella 2).

Attesa di 3h dopo il campionamento: Il tasso di campionamento per *S pneumoniae*, *H influenzae*, *P aeruginosa* e MAC era di 1,55 ± 0,40%, 1,63 ± 1,00%, 3,46 ± 1,03%, e 1,46 ± 0,92%, rispettivamente, con un tasso di campionamento per *P aeruginosa* signifi-

Tabella 3—Tasso di campionamento tramite procedura con SSP*

Variabili	Quota batterica		
	Campione reale, X10 ⁴ ufc/mL	Sospensione, X10 ⁶ ufc/mL	Tasso di campionamento, %
SSP			
<i>S pneumoniae</i>	7,80 ± 1,05	0,69 ± 0,16	0,09 ± 0,02†‡
<i>H influenzae</i>	4,33 ± 0,58	1,70 ± 1,26	0,42 ± 0,33†‡
<i>P aeruginosa</i>	8,10 ± 1,37	22,7 ± 1,15	2,85 ± 0,48
MAC	5,4 ± 6,59	0,22 ± 0,24	0,04 ± 0,02†‡§

*I dati sono espressi come medie ± DS.

†p < 0,05; il tasso di campionamento per *P aeruginosa* era significativamente più alto di quello per *S pneumoniae*, *H influenzae* o MAC in ogni gruppo.

‡p < 0,05; il tasso di campionamento di ogni batterio era significativamente più alto rispetto a quello effettuata con campionamento standard.

§p < 0,05; il tasso di campionamento per MAC era significativamente più basso di quello per *S pneumoniae* e *H influenzae*.

cativamente più alto tra le quattro specie batteriche, in assenza di significative differenze rispetto alla procedura standard.

Surfactante (Soluzione di Tween allo 0,1%): Il tasso di campionamento per *S pneumoniae*, *H influenzae*, *P aeruginosa* e MAC era di $1,94 \pm 0,65\%$, $1,79 \pm 0,35\%$, $4,64 \pm 0,93\%$ e $1,97 \pm 0,82\%$, rispettivamente, dimostrando una significatività più alta per *P aeruginosa* ($p < 0,05$) tra le quattro specie batteriche; al contrario non sono state evidenziate differenze statisticamente significative rispetto alla procedura standard.

Tempi di agitazione del campione con l'utilizzo di un agitatore: Il tempo di agitazione è stato ridotto da 60 a 10 sec. rispetto alla procedura standard. Il tasso di campionamento per *S pneumoniae*, *H influenzae*, *P aeruginosa* e MAC era di $1,47 \pm 0,15\%$, $2,70 \pm 1,60\%$, $3,37 \pm 2,25\%$, e $1,37 \pm 0,72\%$, rispettivamente, in assenza di differenze significative rispetto alla procedura standard.

Confronto con l'SSP: Quando è stato utilizzato l'SSP, il tasso di campionamento per *S pneumoniae*, *H influenzae*, *P aeruginosa* e MAC era di $0,09 \pm 0,02\%$, $0,42 \pm 0,33\%$, $2,85 \pm 0,48\%$ e $0,04 \pm 0,02\%$, rispettivamente, mostrando che il campionamento per *S pneumoniae*, *H influenzae* e MAC effettuato con MCB era significativamente più alto ($p < 0,05$) rispetto a SSP; al contrario non sono state evidenziate differenze significative tra le due procedure per quanto concerne il campionamento dello *P aeruginosa* (Tabella 3).

DISCUSSIONE

Questo studio batteriologico *in vitro* è stato effettuato per introdurre l'MCB come supporto diagnostico *in vitro* delle malattie infettive e la procedura di estrazione delle varie citochine dal FEB riportata da Ishizaka e coll.^{8,9} è stata utilizzata come tecnica standard: (1) il tempo di campionamento era di 30 sec.; (2) la sonda veniva tagliata e posizionata in un tubo contenente soluzione salina; (3) la sonda veniva agitata per 60 sec. utilizzando un agitatore per staccare i batteri legati ad essa; e (4) venivano preparate diluizioni seriate di 1/10, che venivano poi sottoposte a conteggio delle colonie. È stato calcolato il rapporto tra la quota batterica del campione prelevato con la procedura standard dell'MCB e quella presente in sospensione e il valore ottenuto variava quasi costantemente dall'1 al 3%; questo stava ad indicare che quando in 1 mL di campione sono presenti da 33 a 100 cellule batteriche, un batterio può

essere identificato utilizzando l'MCB. Poiché nel BAL di pazienti con PAV, raccolto con il broncoscopio, è presente una quota batterica $\geq 1 \times 10^4$ ufc/mL, i microrganismi sono teoricamente identificabili con l'MCB.¹⁻¹⁸

Per quanto concerne la relazione tra la quota batterica ed il liquido raccolto con l'MCB, è interessante notare il riscontro di una proporzionalità fra i due parametri. In MCB, i batteri vengono adsorbiti quando il liquido viene raccolto dalla sonda. In accordo con Ishizaka e coll.⁸⁻⁹ una sonda ha un potere di assorbimento dai 2 ai 20 μ L che corrisponde allo 0,2-2% di 1mL, e nel nostro esperimento era costante un tasso di campionamento che corrispondeva sistematicamente all'1-3%. L'MCB è in grado di raccogliere 20 μ L di LRE e tutti i batteri in esso presenti, a cui si può associare muco o pus in rapporto alla lesione locale. In questo modo, la rilevazione che utilizza MCB è sufficientemente di tipo quantitativo. Per quanto concerne il tasso di campionamento di ogni specie batterica non sono state evidenziate differenze significative tra *S pneumoniae*, *H influenzae* e MAC; al contrario, il tasso di campionamento per *P Aeruginosa* era significativamente più alto rispetto a quello delle altre specie batteriche. Nonostante non sia chiaro il motivo, *P Aeruginosa* aderisce più facilmente ai tubi polietilenici.

La quota di batteri per campionamento, i tempi di raccolta del campione, i tempi di agitazione e l'utilizzo del surfactante venivano valutati attraverso una modifica della procedura standard utilizzando quattro specie batteriche. Per quanto concerne la quota batterica per campionamento, quando la sospensione veniva sottoposta ad una diluizione di 1/100, essa non si modificava, dimostrando che la quota batterica in sospensione non aveva conseguenze sul tasso di campionamento effettuato con l'MCB. Quando il tempo di campionamento veniva modificato da 30 a 5 sec. ed il tempo di agitazione da 60 a 10 sec., il tasso di campionamento non si modificava; questo indicava che i batteri si staccavano facilmente dalla sonda. Il surfactante aggiunto al campione durante l'agitamento serviva a verificare i suoi effetti sul recupero batterico, ma il tasso di campionamento non si modificava se paragonata all'agitamento del campione in cui era presente soltanto soluzione salina. Quindi, la riduzione in termini di durata della procedura standard può portare a risultati equivalenti e rendere la stessa procedura più facilmente applicabile nella pratica clinica.

È importante anche la valutazione delle condizioni di conservazione del campione (tempi di attesa) successive al campionamento. Il trasporto dei campioni alla sede dell'analisi microbiologica può comportare una perdita di tempo nella pratica clinica. Quando le sonde, dopo il campionamento, venivano

inserite in tubi contenenti soluzione salina per 3 h, la quota batterica di *S pneumoniae*, *H influenzae*, *P Aeruginosa* e MAC non si modificava rispetto a quella valutata tramite procedura standard, evidenziando che la valutazione dei campioni entro le 3 h dal campionamento risulta accettabile per la pratica clinica. Sebbene non abbiamo valutato la conservazione durante la notte o a 4°C, in accordo con Forceville e coll.,¹⁹ quando i batteri presenti nei campioni broncoscopici erano valutati dopo conservazione a 4°C per 48 h. non si evidenziavano modificazioni della quota di Staphilococcus, Enterobatteriaceae e Pseudomonas; questo dimostra che la conservazione è possibile anche se la quantità di Haemophilus si riduceva dopo la conservazione. Poiché l'Haemophilus muore facilmente a basse temperatura e le condizioni di conservazione variano tra le diverse specie batteriche, per valutare i risultati è necessario comprendere le caratteristiche batteriche individuali.

Il tasso di campionamento utilizzando l'SSP e l'MCB è stato confrontato *in vitro*. L'utilità dell'SSP per la diagnosi delle infezioni respiratorie è stata valutata da altri. L'SSP è simile all'MCB per i seguenti motivi: la spazzola è protetta da una guaina e viene spinta fuori soltanto durante il campionamento evitando la contaminazione della flora microbica orale locale, e i batteri vengono raccolti direttamente dalla lesione. Nell'esperimento che utilizza l'SSP, il tasso di campionamento non era costante tra le specie batteriche e quello dello *P Aeruginosa* era evidentemente alto. In confronto con l'MCB, il recupero di *S pneumoniae*, *H influenzae* e MAC utilizzando l'SSP era significativamente più basso rispetto a quello che utilizza l'MCB ma il recupero di *P Aeruginosa* era simile. Poiché soltanto i batteri che aderivano alle spazzole dell'SSP venivano recuperati quando erano direttamente raccolti dalla sospensione batterica, la quota delle tre specie batteriche raccolte tramite SSP era naturalmente più bassa di quella effettuata con MCB ma lo *P Aeruginosa* era altamente aderente alla spazzola. Il tasso di campionamento può essere più alto quando la secrezione purulenta è raccolta dalle lesioni locali delle infezioni.

Questo studio *in vitro* chiarisce che l'MCB è in grado di effettuare campionamenti batterici di tipo quantitativo. Sono necessari altri studi per chiarire la sua applicabilità come tecnica diagnostica, così come è stato fatto per l'SSP ed il BAL che sono stati utilizzati in casi clinici e hanno dimostrato di essere utili.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Loanas M, Ferrer R, Angrill J, et al. Microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2001; 17:791-801
- 2 Lambotte O, Timsit JF, Garrouste-Orgeas M, et al. The significance of distal bronchial samples with commensals in ventilator-associated pneumonia: colonizer or pathogen? *Chest* 2002; 122:1389-1399
- 3 Timsit JF, Misset B, Goldstein FW, et al. Reappraisal of distal diagnostic testing in the diagnosis of ICU-acquired pneumonia. *Chest* 1995; 108:1632-1639
- 4 Wermert D, Marquette CH, Copin MC, et al. Influence of pulmonary bacteriology and histology on the yield of diagnostic procedures in ventilator-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:139-147
- 5 de Jaeger A, Litalien C, Lacroix J, et al. Protected specimen brush or bronchoalveolar lavage to diagnose bacterial nosocomial pneumonia in ventilated adults: a meta-analysis. *Crit Care Med* 1999; 27:2548-2560
- 6 Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997; 111:676-685
- 7 Wimberley N, Faling LJ, Bartlett JG. A fiberoptic bronchoscopy technique to obtain uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119:337-343
- 8 Ishizaka A, Matsuda T, Albertine KH, et al. Elevation of KL-6, a lung epithelial cell marker, in plasma and epithelial lining fluid in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:L1088-L1094
- 9 Ishizaka A, Watanabe M, Yamashita T, et al. New bronchoscopic microsample probe to measure the biochemical constituents in epithelial lining fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001; 29:896-898
- 10 Watanabe M, Ishizaka A, Ikeda E, et al. Contributions of bronchoscopic microsampling in the supplemental diagnosis of small peripheral lung carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:1668-1672
- 11 Yamazaki K, Ogura S, Ishizaka A, et al. Bronchoscopic microsampling method for measuring drug concentration in epithelial lining fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1304-1307
- 12 Ishida T, Hashimoto T, Arita M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan. *Chest* 1998; 114:1588-1593
- 13 Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, et al. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2000; 31:347-382
- 14 Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, et al. 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; 163:1730-1754
- 15 Baughman RP, Tapson V, McIvor A. The diagnosis and treatment challenges in nosocomial pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33:131-139
- 16 Johanson WG, Seidenfeld JJ, Gomez P, et al. Bacteriologic diagnosis of nosocomial pneumonia following prolonged mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1998; 137:259-264
- 17 Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, et al. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N Engl J Med* 1989; 321:863-868
- 18 Yamazaki Y, Kubo K, Sekiguchi M, et al. Analysis of BAL fluid in *M avium-intracellulare* infection in individuals without predisposing lung disease. *Eur Respir J* 1998; 11:1227-1231
- 19 Forceville X, Fiace A, Faibis F, et al. Reproducibility of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage conserved at 4°C for 48 hours. *Intensive Care Med* 2002; 28:857-863