



L'esame microbiologico uretro-cervico-vaginale

Rosanna Predazzer
Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari
Provincia Autonoma di Trento
U.O. Microbiologia e Virologia Ospedale S.chiara

Trento 25 gennaio 2013



Fase preanalitica nell'iter diagnostico delle infezioni genitali

Il Laboratorio deve disporre di:

- Richiesta congrua rispetto al quesito diagnostico
- Campione appropriato alla richiesta e rappresentativa della patologia sulla quale si indaga
- Protocolli diagnostici rapportati alla patologia e condivisi con i clinici
- Procedure scritte sulle modalità di prelievo, trasporto e conservazione dei campioni
- Profili di esami per materiali



Scheda di richiesta, cartacea o informatizzata, dovrebbe riportare:

- Dati socio-anagrafici
- Natura del materiale
- Sede del prelievo
- Esami richiesti
- Motivazione dell'indagine
- Precedenti infezioni
- Fattori di rischio del/lla paziente e del/lla partner
- Sintomi del partner
- Riferite sintomatologie in atto
- Eventuali terapie antibiotiche/antimicotiche recenti



Indicazioni per l'esecuzione del tampone vaginale

- accertare l'eziologia microbica di una sospetta vaginite
- rilevare una condizione di vaginosi
- valutare patologie di prevalenza in caso di dismicrobismo
- valutare uno stato di vaginosi citologica
- finalizzato alla determinazione del pH e del fish odor test, all'allestimento dell'esame microscopico "a fresco" e dopo colorazione di Gram e dell'esame colturale



L'ecosistema vaginale

- L'ambiente vaginale costituisce un complesso ecosistema di comunità microbiche in delicato equilibrio dinamico soggetto a modificazioni fisiologicamente predeterminate ed influenzato da vari fattori (età, stimoli ormonali, stress, sistema immunitario, antagonismo tra specie, contraccettivi, etc.)
- L'essudato vaginale contiene oltre 100 milioni di batteri /ml
- Nella donna in età fertile almeno il 20% di tale microbiota è rappresentato dai lattobacilli

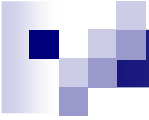


Gram positivi		
	Aerobi	Anaerobi
Cocchi	<ul style="list-style-type: none">■ Streptococchi■ Stafilococchi■ Micrococchi	<ul style="list-style-type: none">■ Streptococchi■ Peptostreptococchi■ Peptococchi
Bacilli	<ul style="list-style-type: none">■ Lattobacilli■ Listeria monoc.	<ul style="list-style-type: none">■ Lattobacilli■ Clostridi■ Eubatteri
Gram negatvi		
Cocchi	<ul style="list-style-type: none">■ Neisseria non gon.	<ul style="list-style-type: none">■ Veilonella
Bacilli	<ul style="list-style-type: none">■ E. Coli■ Proteus■ Klebsiella■ Pseudomonas■ Micoplasma, Ureaplasma	<ul style="list-style-type: none">■ Bacteroides



L'ecosistema vaginale: lattobacilli

- Lattobacilli sono in grado di metabolizzare il glicogeno mantenendo acido il p H vaginale ai livelli fisiologici (3,5-4,8), producono perossido di idrogeno, e batteriocidine, fattori fondamentali per inibire lo sviluppo di germi patogeni
- L'evento patologico in questo distretto si realizza o per il superamento della concorrenza vitale della flora autoctona e dei meccanismi immunitari da parte di specie alloctone o per lo sconvolgimento dell'equilibrio quali-quantitativo del microbiota residente

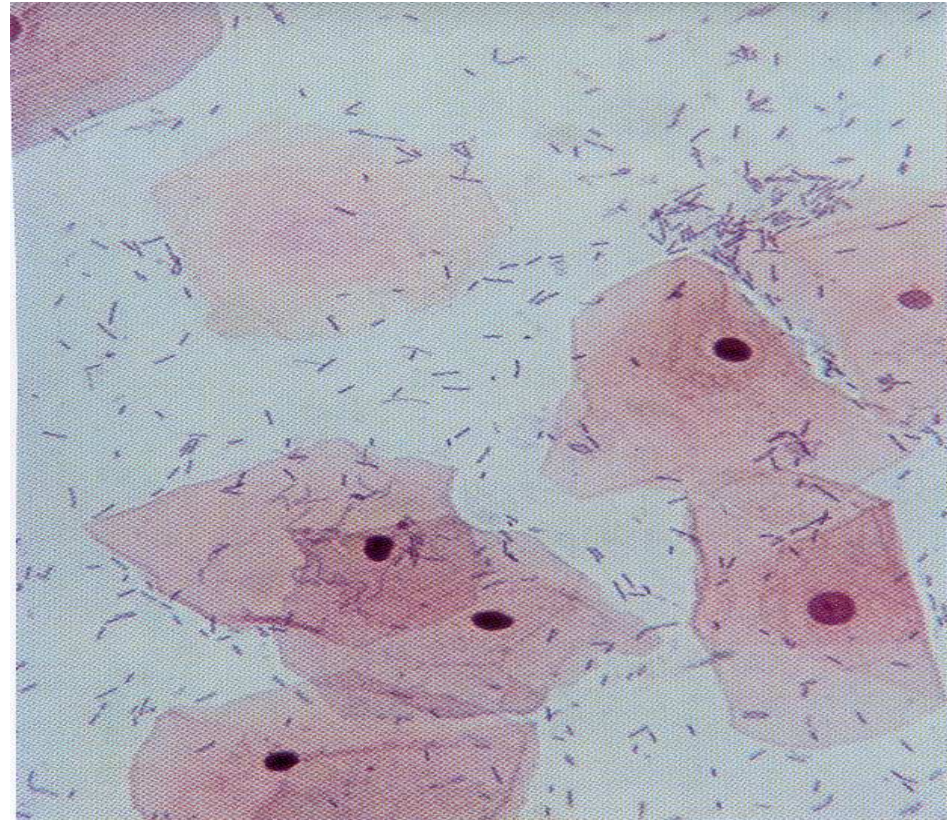
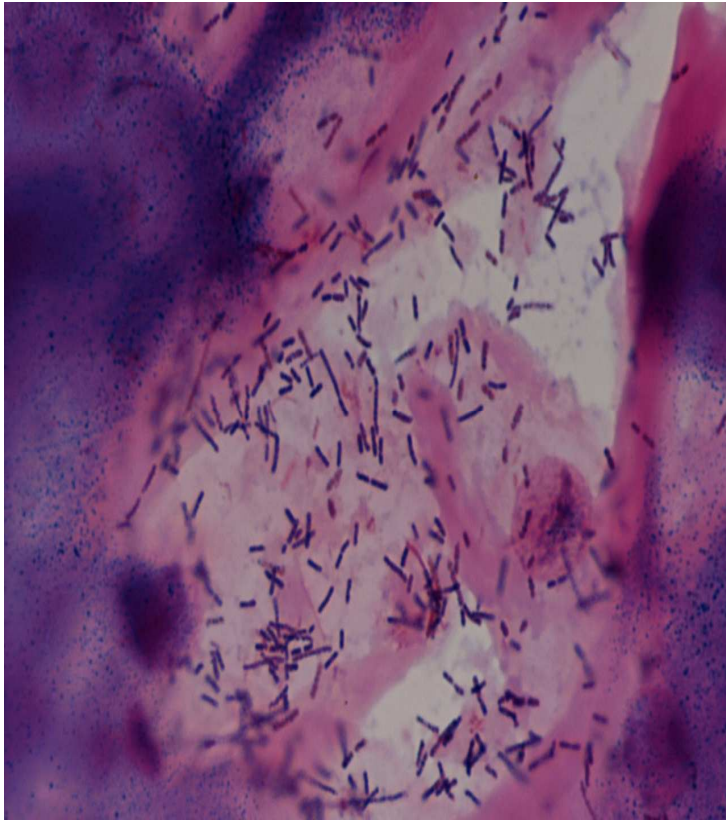
- 
- I componenti dell'ecosistema subiscono cambiamenti in base al ciclo mestruale, all'attività sessuale, allo stato ormonale e allo stato generale di salute



L'eziologia e l'approccio a una paziente affetta da vulvo-vaginite sono età dipendenti

La patologia infiammatoria del tratto inferiore delle vie genitali femminili rappresenta attualmente la causa più frequente di consultazione specialistica a tutte le età

Morfotipi normali





Vulvo-vaginiti

- Infezioni del tratto genitale femminile attribuibili prevalentemente a miceti appartenenti al genere *Candida spp*, al protozoo *T. vaginalis*, e ai batteri responsabili di vaginosi batterica (*Gardnerella vaginalis*, *Mobilincus spp*, *Bacteroides spp*) caratterizzate da perdite vaginali, prurito, bruciore, dolore pelvico e dispareunia



Secreto vaginale: potenziali agenti eziologici

Gardnerella vaginalis (solo in caso di vaginosi)

Streptococcus agalactiae (solo in gravidanza)

Staphylococcus aureus

Listeria spp (solo in gravidanza)

Anaerobi

Streptococcus pyogenes (età pediatrica)

Haemophilus spp. (età pediatrica)


Miceti

Trichomonas vaginalis

Stafilococchi coagulasi
negativi

Enterococchi

Enterobatteri



Solo in assenza di lattobacilli e con
uno stato flogistico testimoniato
dalla presenza
di un elevato numero di leucociti



Iter diagnostico di laboratorio

Le ricerche specifiche si dividono in:

- indagini di I° livello: ricerca *Candida Spp*, *T.vaginalis* e vaginosi batterica
- Indagini di II° livello: ricerca di altri patogeni sulla base del Gram e/o dati anamnestici.



Infezioni micotiche vulvo-vaginali

- Il 10%-22% delle donne in età fertile, il 30-40% delle donne in gravidanza ed il 60-65% delle donne HIV+ sono colonizzate da *Candida spp* in modo asintomatico,
- Rappresentano circa il 30-35% delle infezioni vaginali, la prima causa in Italia e la seconda negli Stati Uniti, tipiche dell'età riproduttiva e a diffusione ubiquitaria
- Costituiscono una delle più frequenti cause di consultazione ginecologica
- Sostenute nel 70-80% dei casi da *Candida albicans*, con un aumento del coinvolgimento delle specie non-albicans
- Si stima che circa il 75% delle donne vada incontro nella vita ad almeno un caso di vulvovaginite micotica, che nel 40-50% dei casi vada incontro a episodi ricorrenti e sviluppi nel 5% dei casi una forma recidivante
- Di solito insorgono a seguito di trattamenti antibiotici prolungati o ripetuti che compromettono la normale flora batterica residente e a seguito di un abbassamento delle difese immunitarie



Vulvo-vaginite da *Trichomonas vaginalis*

- Rappresenta la più diffusa IST non virale nel mondo con prevalenza superiore a quella di *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*; secondo OMS costituisce circa metà di tutte le IST curabili con circa 190 nuovi casi/anno nel mondo
- Infezione asintomatica nel 10-50% dei casi
- Distribuita in modo uniforme fra tutte le donne sessualmente attive di tutte le fasce di età
- Infezione quasi esclusivamente a trasmissione sessuale anche se non si escludono modalità tramite biancheria intima, accappatoi e asciugamani contaminati; più raramente attraverso strumenti diagnostici contaminati o in bagni pubblici
- Prevalenza maggiore (circa 70%) nei soggetti a rischio: prostitute, persone con differenti partners o affetti da altre malattie veneree
- Associata secondo studi recenti ad un aumentato rischio di trasmissione di HIV

Vaginosi batterica


- **Sindrome polimicrobica** caratterizzata da una riduzione dei lattobacilli H₂O₂ produttori e da una contemporanea proliferazione di altri microrganismi aerobi ed anaerobi
 - **Gardnerella vaginalis**
 - **Mycoplasma Hominis**
 - **Prevotella**
 - **Mobiluncus sp**

Rapporto batteri anerobobi/ batteri aerobi




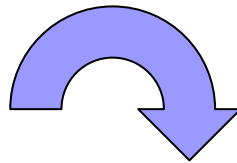
Flora batterica normale 2:1 - 5:1

Vaginosi batterica 100:1 - 1000:1

- 
- Rappresenta una delle più frequenti infezioni vaginali nella donna in età fertile
 - Incidenza varia dal 10 al 40% a seconda delle popolazioni considerate
 - Prevalenza varia a seconda del setting, maggiore nelle pazienti affetti da IST
 - Recenti studi evidenziano che 1 donna su 3 risulta positiva per VB; prevalenza del 23% in donne di età compresa tra 14 e 19 anni del 28-31% nelle donne oltre i 20 anni

Alloworth JE Obstetrics & Gynecology 2007

- 
- Generalmente non considerata a trasmissione sessuale, ma appare correlata all'attività sessuale
 - 50 % delle donne: perdite vaginali maleodoranti, fluide, biancastre, non viscosi, schiumose
 - 50% delle donne: asintomatiche
 - diagnosi facilmente effettuata basandosi sui criteri definiti da Amsel
 - secrezioni vaginali con aspetto omogeneo
 - Ph vaginale >4,5
 - fish odor test positivo
 - presenza di clue cells all'osservazione microscopica



presenza di tre delle quattro condizioni definisce un quadro di VB

sensibilità 90%

Score di Nugent

- Metodica più utilizzata ed accettata dalla linee guida internazionali
- Score ricavato dal rapporto tra i diversi morfotipi batterici; positivo ≥ 7
- Score: 7-10 in presenza di vaginosi batterica
- Score: 0-3 esclusione di VB
- Score: 4-7 si rimanda alle evidenze cliniche

Morfotipi batterici	punteggio				
	0	1*	2*	3*	4*
Bastoncini Gram+	4		2	1	0
		3			
Coccobacilli Gram variabili	0		2	3	4
		1			
Bastoncini ricurvi Gram-/ variabili	0	1	2	3	4


Punti: 0-3 Flora normale; 4-6 Dismicrobismo; 7-10 Vaginosi batterica
 1*: <1 batteri visti al Gram a ingrandimento 1000X
 2*: 1-5 batteri visti al Gram a ingrandimento 1000X
 3*: 6-30 batteri visti al Gram a ingrandimento 1000X
 4*: >60 batteri visti al Gram a ingrandimento 1000X



Modalità di prelievo tampone vaginale

Norme a cui attenersi per rendere attendibile l'esito dell'esame:

- Non essere in periodo mestruale
- Non eseguire irrigazioni vaginali nelle 3 giorni precedenti l'esame
- Aver cessato qualsiasi terapia da almeno 3-5 giorni
- Non avere rapporti sessuali nelle 3 giorni precedenti l'esame

- 
- **Prelievo effettuato a livello del fornice posteriore previa introduzione di uno speculum bivalve sterile per non contaminare con la flora vulvare**
 - In gravidanza da eseguire verso la 35-36 settimane di gestazione per la prevenzione dell'infezione neonatale da *Streptococcus agalactiae*; da effettuarsi contemporaneamente la ricerca a livello rettale
 - Età pediatrica: può essere eseguito su secreto vaginale e su tampone vulvare in caso di sintomatologia a carico dei vaginali esterni (per ricerca di miceti lieviformi)
 - Il pH va misurato prima dell'inserimento dello speculum sulle pareti vaginali laterali utilizzando cartine indicatrici con range 3.5-5



Tipologia di tamponi

- Non tutti i tamponi di cotone in commercio sono ugualmente idonei
- Tamponi di cotone utilizzabili per la ricerca di *T. vaginalis* e per la diagnosi di vaginosi batterica ma non idonei per l'esame colturale e le metodiche di biologia molecolare
- Utilizzabili tamponi di dracon o rayon per tampone vaginale
- Per tutti i tipi di prelievo, i tamponi floccati risultano utili per l'esame citologico, esame microscopico, esame colturale e le ricerche in biologia molecolare



Modalità di conservazione e trasporto

- Per l'esame colturale il prelievo deve pervenire in laboratorio entro 24 ore conservato a temperatura ambiente
- Nelle secrezioni vaginali prelevate con tampone la vitalità di *T. vaginalis* si mantiene per 15-20' se non inoculato nell'apposito terreno di coltura, ma sopravvive fino a 24 h in tamponi con terreno di trasporto conservati a temperatura ambiente
- Per l'allestimento del vetrino a fresco e la determinazione del, Fish odor test in Laboratorio, quest'ultima imprescindibile a $\text{pH} > 4$, il tampone va stemperato subito in una provetta contenente 1 ml di fisiologica sterile preriscaldata a 37°C . Per la determinazione di *T.vaginalis* la provetta va mantenuta in termostato fino all'osservazione microscopica
- E' opportuno che il vetrino per la colorazione di Gram venga allestito al momento del prelievo e conservato a temperatura ambiente e non dal tampone inviato al Laboratorio



L'approccio diagnostico in laboratorio non può essere disgiunto dall'osservazione globale della situazione del microbiota vaginale attraverso l'esame microscopico, da effettuarsi a fresco e previa colorazione di Gram

Esame microscopico

- Esso consente la valutazione morfotipica della flora batterica e micotica, mediante una fotografia in tempo reale del microbiota presente
- Le specie microbiche, i miceti, i leucociti devono essere rilevate in modo semiquantitativo
- Da effettuarsi sempre un'indicazione semiquantitativa della flora lattobacillare (assente, scarsa, discreta, abbondante)
- Consente la valutazione della presenza di clue cells nei casi di vaginosi batterica



Esame microscopico a fresco

- Deve essere effettuato immediatamente dopo il prelievo stemperando il tampone in 0.5 ml di soluzione fisiologica sterile, deponendo poi due gocce su un vetrino
- Consente di valutare il quadro generale dell' ecosistema vaginale (Microbiota, cellule infiammatorie)
- E', in genere, sufficiente per porre diagnosi di diagnosi di trichomoniasi in presenza di organismi dotati di mobilità attiva
- E', insieme all'esame microscopico Gram, l'unico esame utile per la diagnosi di vaginite citolitica o lattobacillosi vaginale
- È uno degli esami principi per la diagnosi di vaginosi batterica (clue cells)
- Consente di rilevare la presenza di Candida in almeno il 40-60% dei casi
- Sensibilità nelle trichomoniasi 60-70% rispetto all'esame colturale (100% se >100 mila /ml), il cui esito negativo non esclude la tricomoniasi. Possibilità di falsi negativi dovuti all'alterazione morfologica dei parassiti
- Frequente sottostima quantitativa della flora lattobacillare



Esame colturale

- Deve essere eseguito il più presto possibile dal tampone appena prelevato o inviato in Laboratorio, obbligatoriamente in terreno di trasporto
- dovrebbe essere eseguito dopo osservazione microscopica che indirizza sulla tipologia di terreni da utilizzare
- Il tampone va stemperato in 1 ml di fisiologica sterile e seminati 100µl

Terreni:

- Agar sangue (Columbia, TSA, etc.+ 5% sangue di montone)
- Agar sangue cotto
- Agar Sabouraud
- Brodo per Trichomonas (più sensibile dell'esame microscopico 300-500 parassiti/ml) , risultati disponibili non prima di 3-7 giorni

Per tamponi vulvari in età pediatrica seminare sempre una piastra di Columbia CNA per *S.pyogenes* e di Agar cioccolato per *Haemophylus spp*

Shaedler e Shaedler K+V nei casi di vaginosi batterica non associata a Gardnerella e nelle portatrici di IUD

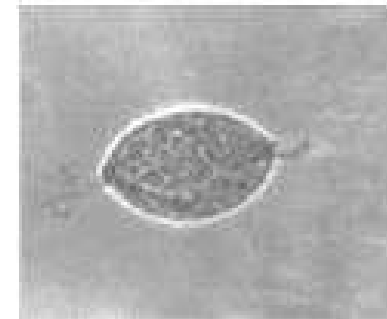
VAGINITE DA CANDIDA

- pH <4.5
- Fish odor (whiff test): Assente
- Es.microscopico a fresco e dopo Gram: presenza di numerosi leucociti, presenza di blastospore e/o ife, microbiota in genere conservato con lattobacilli presenti, a volte alterato per lo stato infiammatorio
- Es.colturale: Presenza di colonie di Candida (valutare sempre la specie) in quantità cospicua



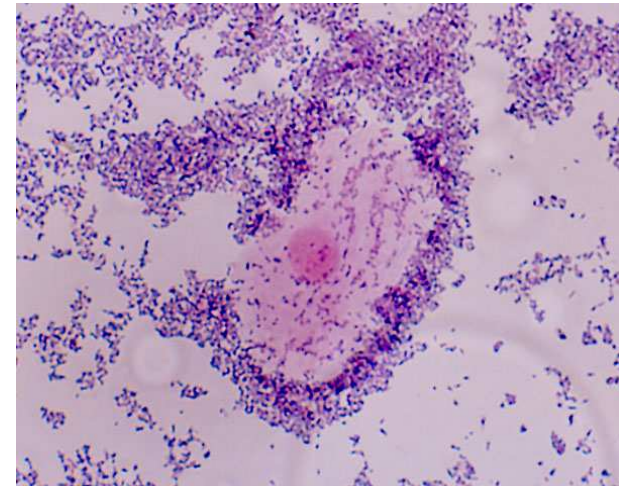
VAGINITE DA TRICHOMONAS VAGINALIS

- pH > 5.0
- Fish odor (whiff test): presente
- Es. microscopico a fresco: presenza di protozoi flagellati mobili, presenza di numerosi leucociti, presenza di un microbiota alterato con lattobacilli assenti o rari (<5/c.m.1000x)
- Es. microscopico Gram: Presenza di numerosi leucociti, presenza di un microbiota alterato con lattobacilli assenti o rari (<5/c.m.1000x), presenza di cocci e batteri Gram + e



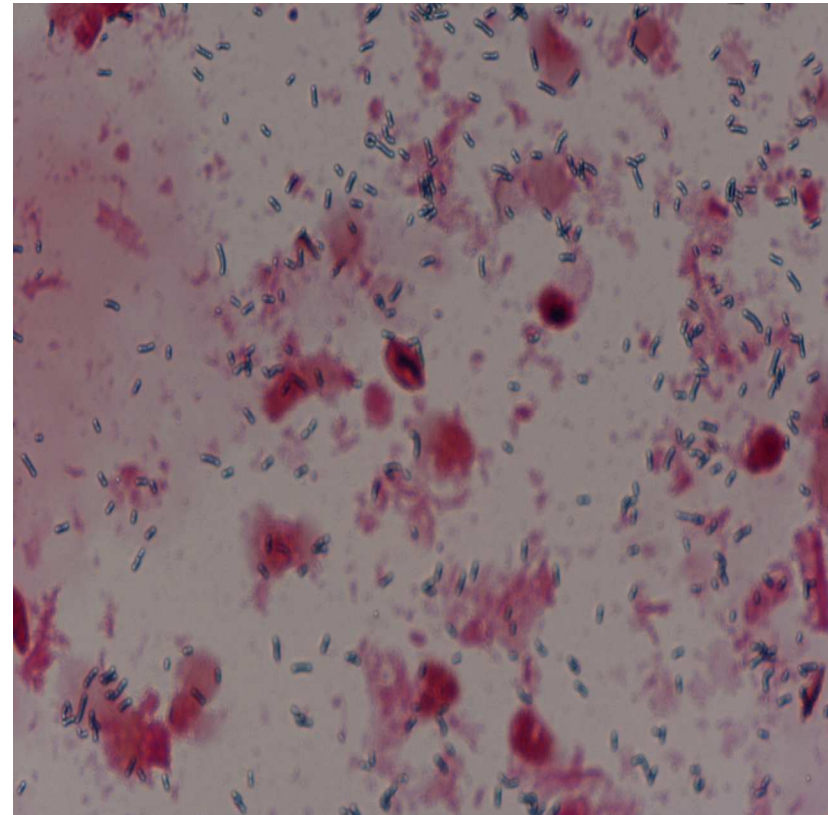
VAGINOSI BATTERICA

- pH >5.0
- Fish odor (whiff test): Presente
- Es.microscopico a fresco e dopo Gram: presenza di numerosi morfotipi Bacteroides/Gardnerella, numerosi cocco-bacilli Gram variabili, presenza di clue cells, a volte presenza di numerosi morfotipi di Mobiluncus.
Microbiota alterato con lattobacilli assenti o rari
- Es.colturale:La rilevazione di *G.vaginalis* non è indicativa di BV, in quanto presente nel 20-40% delle donne sane



VAGINITE CITOLITICA


- pH <4.5
- Fish odor (whiff test): Assente
- Es.microscopico a fresco e dopo Gram: presenza di numerosi leucociti, microbiota sempre conservato con numerosi lattobacilli, ampie aree di citolisi con le cellule epiteliali
- Es.colturale: Non significativo





Indicazioni per l'esecuzione del tampono cervicale

- accertare routinariamente la presenza di *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* in donne che presentano segni e sintomi di cervicite e in donne che stiano eseguendo indagini a scopo preventivo
- ricerca di *Mycoplasma/Ureoplasma* da interpretare dopo attenta valutazione dell'equilibrio dell'ecosistema batterico
- finalizzato all'esame microscopico e all'esame colturale



Modalità di prelievo tampone cervicale

**Prelievo effettuato a livello endocervicale
previa introduzione di uno speculum bivalve
sterile**

- Rimuovere l'eccesso di muco cervicale mediante tampone secco
- inserire il tampone nell'endocervice per circa 1 cm
- per la ricerca di *Chlamydia trachomatis* il tampone va inserito per 1.5 cm oltre la giunzione squamosa



Secreto cervicale: potenziali agenti eziologici

Neisseria gonorrhoeae

Chlamydia trachomatis

Anaerobi

Micoplasmi ($> 10^4$ UFC/ml)



Indicazioni per l'esecuzione del tampone uretrale nell'uomo

- In caso di secrezione purulenta o vischioso-filamentosa dal meato uretrale, con o senza sintomatologia.
- Nel caso in cui siano stati isolati nella partner microrganismi tipicamente responsabili di IST
- Utile anche nella ricerca eziologica di epididimite e negli screening per l'infertilità
- Non indicato nella diagnosi di prostatiti
- Finalizzato in tutti i casi, all'allestimento dell'esame microscopico per la valutazione della flogosi e per confermare il sospetto di uretrite



Indicazioni per l'esecuzione del tampone uretrale nella donna

- Nel caso di persistenza della sintomatologia uretrale con urinocoltura negativa
- In caso di sindrome uretrale acuta
- Finalizzato all'allestimento dell'esame microscopico per la valutazione della flogosi e come indicatore di una eventuale contaminazione vaginale



Modalità di prelievo tampone uretrale

Prelievo effettuato introducendo un tampone sottile nell'uretra per circa 1 cm, dopo rimozione del muco mediante tampone a secco

- Norme a cui attenersi per rendere attendibile l'esito dell'esame sono le stesse viste per il tampone vaginale
- Non aver urinato da almeno 3 ore



Secreto uretrale: potenziali agenti eziologici

Gardnerella vaginalis

Streptococcus agalactiae

Staphylococcus aureus e SNC

Enterobacteriaceae

Neisseria gonorrhoeae

Chlamydia trachomatis

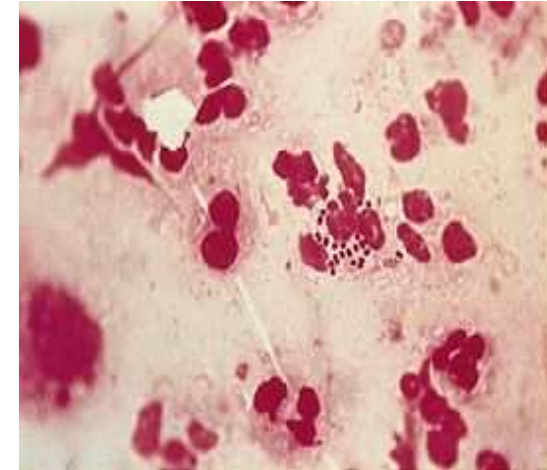
Micoplasmi

Miceti

Trichomonas vaginalis

Ricerca di *Neisseria gonorrhoeae*:

- Il vetrino per la colorazione di Gram andrebbe allestito al momento del prelievo e non dal tampone inviato in laboratorio
- L'esame microscopico dopo colorazione di Gram presenta una sensibilità del 90% e una specificità del 95% nei maschi sintomatici, sensibilità che si riduce a 65% nei maschi asintomatici e nei campioni endocervicali
- il tampone andrebbe seminato subito dopo il prelievo su piastra Agar cioccolato e Agar Thayer Martin preriscaldate a 37°C per 5'; in alternativa utilizzare tamponi con terreno di trasporto privo di glicerofosfato
- il tampone andrebbe sempre conservato a temperatura ambiente e mai refrigerato





L'esame colturale:

- risulta altamente specifico e sensibile,
 - consente l'allestimento dell'antibiogramma
 - applicabile a più tipologie di campione (t. faringeo. t.rettale, urine)
 - consente la conservazione del ceppo per indagini future
 - test a basso costo
 - risente delle condizioni di conservazione /trasporto del campione
-
- Secondo le linee guida internazionali la valutazione del profilo diantibiotico-sensibilità deve sempre comprendere lo studio della produzione di β -lattamasi, della sensibilità alla ciprofloxacina e al ceftriaxone, visto l'aumento del tasso di resistenza ai chinoloni

 - Secondo le linee guida la positività ai test in biologia molecolare va confermata mediante esame colturale



La refertazione dovrebbe:

- specificare il metodo diagnostico utilizzato
- prevedere in calce un breve commento esplicativo
- utilizzare un'uniformità di refertazione per rendere confrontabili i dati con altri Laboratori che dovrebbero partecipare ad una rete nazionale di raccolta dati
- sul prelievo vaginale. riportare la determinazione del pH, la produzione di amine (fish odor test), la valutazione microscopica della componente flogistica e microbica in termini semiquantitativi o mediante relativo score; riportare antibiogramma dei germi isolati in caso di dismicrobismo, dopo attenta valutazione del significato patognomonico
- sul prelievo cervicale e uterale riportare la valutazione della componente flogistica e il risultato della *ricerca colturale e microscopica di N. gonorrhoeae, della ricerca di C.trachomatis* e di micoplasmi con relativo antibiogramma
 - La possibile presenza di altri patogeni dopo valutazione del significatività patognomonica con relativo antibiogramma



Grazie per l'attenzione

