associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Rif.2025-26

Sostituisce 2024-26

PERCORSO DIAGNOSTICO

POLMONITI NEL PAZIENTE OSPEDALIZZATO



Proprietà intellettuale di AMCLI ETS

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Polmoniti nel paziente ospedalizzato Rif. 2025-26.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani ETS (AMCLI ETS)
Via C. Farini 81 - 20159 Milano - T. 02 66801190 - segreteriaamcli@amcli.it N. 26168 iscrizione RUNTS - sez. "G - altri enti del Terzo Settore" - Iscrizione REA MI - 1969948 C.F. 06653690153 - P.I. 12404560158

MODIFICHE

- Frontespizio: modalità di citazione
- E6 – La valutazione microbiologica della colonizzazione delle basse vie respiratorie
- Allegato 3, paragrafo 3.4B
- Allegato 3, paragrafo 4.4 B
- Interlinea e numerazione delle pagine

REFERENTE

Claudio Farina

Già SC Microbiologia e Virologia Clinica, ASST "Papa Giovanni XXIII", Bergamo

COORDINATORE

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Claudio Farina - cfarina.microbg@gmail.com

REFERENTE

Claudio Farina
Già SC Microbiologia e Virologia Clinica, ASST "Papa Giovanni XXIII", Bergamo

ESTENSORI DEL DOCUMENTO

Stefano Aliberti
Respiratory Unit, IRCCS Humanitas *Research Hospital*, Rozzano (Milano) e *Department of Biomedical Sciences*, Humanitas *University*, Pieve Emanuele (Milano)
Società Italiana di Pneumologia (SIP-IRS)

Francesco Amati
Respiratory Unit, IRCCS Humanitas *Research Hospital*, Rozzano (Milano) e *Department of Biomedical Sciences*, Humanitas *University*, Pieve Emanuele (Milano)
Società Italiana di Pneumologia (SIP-IRS)

Fabio Arena
UOC Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti" e Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Foggia, Foggia;
Gruppo di Lavoro per le infezioni nel paziente critico (GLIPAC), AMCLI

Giancarlo Basaglia
SC Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria Friuli Occidentale, Presidio Ospedaliero "S. Maria degli Angeli", Pordenone;
Gruppo di Lavoro per le infezioni correlate all'assistenza e dei dispositivi impiantabili (GLICADI), AMCLI

Gioconda Brigante
SC Microbiologia e Virologia Clinica, Azienda Socio-Sanitaria Territoriale della Valle Olona, Ospedale di Gallarate, Gallarate;
Gruppo di Lavoro per l'aggiornamento dei criteri di standardizzazione dell'antibiogramma (GLACSA), AMCLI

Anna Camaggi
SC Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità", Novara;
Gruppo di Lavoro per lo sviluppo professionale continuo dei tecnici di laboratorio (GLATELAB), AMCLI

Paola Faverio
UOC Pneumologia, IRCCS San Gerardo dei Tintori, Monza; School of Medicine and Surgery, Università degli Studi di Milano Bicocca, Milano
Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO)

Paolo Fazii
UOC Microbiologia e Virologia Clinica, Azienda Sanitaria Locale Pescara, Presidio Ospedaliero "Santo Spirito", Pescara;
Gruppo di Lavoro sulle antropozoonosi (GLAZOO), AMCLI

Ersilia Fiscarelli
Gruppo di Lavoro per la Fibrosi Cistica (GLAFICI), AMCLI

Carla Fontana
UOC Microbiologia e Banca Biologica, Istituto Nazionale Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani" - IRCCS, Roma;
Gruppo di Lavoro *One Health* (GLONE), AMCLI

Daniele Roberto Giacobbe
UO Clinica Malattie Infettive e Tropicali, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino e Dipartimento di Scienze della Salute (DISSAL), Università degli Studi di Genova, Genova;
Società Italiana di Terapia Antinfettiva (SITA)

Cristina Giraldi
Gruppo di Lavoro organizzativo dei percorsi diagnostici (GLOPD), AMCLI

Massimo Giusti
SC Medicina per intensità di cure 2, Ospedale "San Giovanni Bosco", ASL Città di Torino, Torino;
Federazione delle Associazioni dei Dirigenti Ospedalieri Internisti (FADOI)

Tiziana Lazzarotto
UOC Microbiologia, IRCCS Policlinico di Sant'Orsola e Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche – DIMEC, *Alma Mater Studiorum* Università degli Studi di Bologna, Bologna;
Gruppo di Lavoro per le infezioni nel trapianto (GLAIT), AMCLI

Gianluigi Lombardi
SC Microbiologia Clinica, Azienda Socio-Sanitaria Territoriale "Grande Ospedale Metropolitano Niguarda", Milano;
Comitato di Studio per la Micologia (CoSM), AMCLI

Fabio Midulla
SC Pediatria d'Urgenza, Policlinico Umberto I e Dipartimento Materno Infantile e Scienze urologiche, Università degli Studi "La Sapienza", Roma
Società Italiana di Pediatria (SIP)

Roberta Migliavacca
Unità Microbiologia e Microbiologia Clinica, Dipartimento Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche, Università degli Studi di Pavia, Pavia;
Gruppo di Lavoro per lo studio delle infezioni nelle Residenze Sanitarie Assistite e Strutture Territoriali Assimilabili (GLISTER), AMCLI

Angelo Pan
UOC Malattie Infettive e Tropicali, Azienda Socio-Sanitaria Territoriale Cremona, "Ospedale di Cremona", Cremona;
Società Italiana Multidisciplinare per la Prevenzione delle Infezioni nelle Organizzazioni Sanitarie (SIMPIOS)

Elena Pariani
Dipartimento di Scienze Biomediche per la salute, Università degli Studi di Milano, Milano;
Gruppo di Lavoro per le infezioni virali respiratorie, severe e non (GLIVIRE) AMCLI

Antonio Piralla
SC Microbiologia e Virologia, Fondazione IRCCS "Policlinico San Matteo", Pavia;
Gruppo di Lavoro per le infezioni virali respiratorie, severe e non (GLIVIRE) AMCLI

Annibale Raglio
Comitato di Studio per la Parassitologia (COSP), AMCLI
Società Italiana Multidisciplinare per la Prevenzione delle Infezioni nelle Organizzazioni Sanitarie (SIMPIOS)

Teresa Spanu
UOC Microbiologia, Fondazione Policlinico Universitario "Agostino Gemelli" IRCCS,
Comitato di Studio per gli Antimicrobici (CoSA), AMCLI

Mario Venditti
Dipartimento di Sanità Pubblica e di Malattie Infettive, Università degli Studi "La Sapienza", Roma
Gruppo Italiano per la *Stewardship* antimicrobica (GISA)

REVISORI ESTERNI

Roberto Fumagalli
SC Anestesia e Rianimazione 1, Azienda Socio-Sanitaria Territoriale "Grande Ospedale Metropolitano Niguarda", Milano; *School of Medicine and Surgery*, Università degli Studi di Milano Bicocca, Milano

Maurizio Sanguinetti
Dipartimento di Scienze di Laboratorio e Infettivologiche, Fondazione Policlinico Universitario "Agostino Gemelli IRCCS e Università Cattolica del S. Cuore, Roma; ESCMID *Immediate Past President*

Pierluigi Viale
UO Malattie Infettive, IRCCS Policlinico di S. Orsola e Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, *Alma Mater Studiorum* Università degli Studi di Bologna, Bologna

SOMMARIO

A. Premessa e Obiettivi 7

Bibliografia essenziale 9

B. Le polmoniti comunitarie 9

B1 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE IN ETA' NEONATALE E PADIATRICA 12

B2 'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE IN ETA' ADULTA 13

B3 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE IN ETA' GERIATRICA 17

B4 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE NEL SOGGETTO CON "PATOLOGIE STRUTTURALI DEL POLMONE" 187

B5 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE NEL SOGGETTO VARIAMENTE IMMUNODEPRESSO 19

B6 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLA MALATTIA BRONCHIECTASICA 22

B7 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE DEl VIAGGIATORE 23

B8 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE DEL SOGGETTO ESPOSTO A CONTATTI CON ANIMALI 27

Bibliografia essenziale 28

C. Le polmoniti nosocomiali 31

C1 L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI NOSOCOMIALI 32

Bibliografia essenziale 35

D. La diagnosi microbiologica di infezione delle basse vie respiratorie 37

E. Le modalità della diagnosi microbiologica 39

E1 LA FASE PRE-ANALITICA 40

E2 LA DIAGNOSI BATTERIOLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE 45

E3 LA DIAGNOSI MICOLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE 50

E4 LA DIAGNOSI PARASSITOLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE 52

E5 LA DIAGNOSI VIROLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE 53

E6 LA VALUTAZIONEMICROBIOLOGICA DELLA COLONIZZAZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE 56

E7 LA CEPPOTECA/SIEROTECA 57

Bibliografia essenziale 57

F. Conclusioni 60

Bibliografia essenziale 64

G. *Link* a percorsi AMCLI ETS **64**

ALLEGATO 1 - PRELIEVO ED INVIO DEI MATERIALI RESPIRATORI AL LABORAtORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA CLINICA 65

ALLEGATO 2 - LE *FLOW CHART* OPERATIVE 78

ALLEGATO 3 - I MATERIALI RESPIRATORI: LA FASE ANALITICA E LA REFERTAZIONE 83

ALLEGATO 4 - INDICATORI PER IL PERCORSO DIAGNOSTICO DELLE POLMONITI 99

A. PREMESSA E OBIETTIVI

Le infezioni delle basse vie respiratorie (*Lower Respiratory Tract Infections*, LRTI) includono tutti i processi infettivi a carico del parenchima polmonare (polmoniti) e dei bronchioli (bronchioliti), oltre all'ascesso polmonare (in cui la costituzione del parenchima è sovvertita per l'esistenza di cavità contenenti materiale purulento) e all'empiema (in cui il pus occupa lo spazio pleurico).
Il presente documento, finalizzato alla definizione della diagnosi eziologica, si riferisce esclusivamente al processo infettivo localizzato al parenchima polmonare: la polmonite. Sono descritti gli aspetti relativi alle due forme nosologicamente più rilevanti di polmonite: la forma comunitaria che necessita di ricovero ospedaliero e quella nosocomiale.

Per quanto concerne le forme di polmonite acquisita in comunità - *Community-Acquired Pneumonia* (CAP) - che, per la gravità del quadro clinico, possono richiedere l'ospedalizzazione del paziente, si prendono in considerazione gli aspetti relativi a diverse fasce di età (neonatale e pediatrica, giovane-adulta, geriatrica) ed a differenti categorie a rischio (i viaggiatori, i soggetti a contatto con animali, i soggetti immunodepressi, e i soggetti con preesistenti patologie polmonari). Si segnala che il ricorso alle procedure di diagnosi eziologica è raccomandato solo per le CAP che richiedono l'ospedalizzazione, poiché per le altre, valutate dal medico di Medicina Generale o dal medico di Pronto Soccorso, l'approccio terapeutico deriva esclusivamente dalle valutazioni radiologiche del torace e degli indici di gravità, quali lo *Pneumonia Severity Index*. Si segnala che recentemente nella definizione delle LRTI sono state comprese le seguenti forme: LRTI propriamente dette, Bronchite Acuta (AB), sospetta polmonite acquisita in comunità (sCAP), polmonite acquisita in comunità certa (CAP), polmonite acquisita in residenze sanitarie (NHAP), riacutizzazione acuta di Broncopatia Cronica Ostruttiva (AECOPD), riacutizzazione acuta di bronchiectasie (AEBX).

Per quanto concerne, invece, la forma nosocomiale, si definiscono: 1. *Hospital-Acquired Pneumonia* (HAP) le forme cliniche che insorgono dopo almeno 48 ore dal ricovero; 2. *Stroke Associated Pneumonia* (SAP) le forme cliniche che compaiono nella prima settimana dopo un evento ischemico cerebrale, ed infine 3. *Ventilator-Associated Pneumonia* (VAP) le forme che si osservano dopo almeno 48 ore dall'intubazione endotracheale. La definizione di *Health Care-Associated Pneumonia* (HCAP), indicata per le forme che si manifestano in pazienti ospedalizzati per almeno due giorni nei tre mesi precedenti, oppure provenienti da strutture di lungodegenza o sottoposti a procedure mediche [emodialisi, trattamento di ferite, terapie antibiotiche endovenose recenti (3 mesi)] è ormai caduta in disuso in quanto ha determinato un aumentato uso di antibiotici ad ampio spettro ed un incremento della spesa sanitaria senza vantaggi in termini di *outcome*. Recentemente è stato introdotto il concetto di *Ventilator-Associated Tracheobronchitis* (VAT), peraltro oggetto di discussione, che è una LRTI che interessa l'albero tracheobronchiale ma che risparmia il parenchima polmonare e che potrebbe essere prodromica di VAP.

Si segnala che, poiché la diagnosi di VAP può essere basata su criteri interpretativi soggettivi, alcuni Autori hanno proposto anche le *Ventilator-Associated Conditions* (VAC) definite per un significativo incremento del supporto ventilatorio o della frazione inspirata di ossigeno dopo un periodo di supporto stabile o decresciuto: le VAC sarebbero associate ad un *range* di complicanze infettive simili a quelle tipiche delle VAP ma caratterizzate da maggiori rapidità diagnostica, obiettività e predittività. Ancora più nel

dettaglio, le *Infection-Related Ventilator-Associated Complications* (IVAC) descrivono, in aggiunta, alterazioni della temperatura corporea (<36°C o >38°C) o del numero di leucociti circolanti (<4000 cell/mm^3 o >12.000 cell/mm^3) dimostrate nei quattro giorni da cui è stato introdotto un nuovo regime di antibioticoterapia. A queste devono essere aggiunte le *Possible* e le *Probable Ventilator Associated Pneumonia* (PsVAP e PrVAP) definite, in aggiunta alle precedenti indicazioni, dalla rilevazione – su base clinica – di secrezioni respiratorie o – su base microbiologica – dalla positività colturale.

Ai fini dell'elaborazione del presente documento le forme di HAP, HCAP e VAP sono considerate globalmente, trattando – di fatto – le "polmoniti in corso di ospedalizzazione" nel loro complesso. Per le CAP che non richiedono il ricovero non si prevede, invece, alcun accertamento di diagnosi microbiologica, salvo che in casi di possibile rischio epidemico (ad esempio: legionellosi) o per ragioni di sorveglianza epidemiologica (ad esempio: virosi).

Scopo di questo documento è la definizione delle nozioni di base in tema di polmoniti di comunità che richiedono ospedalizzazione ed ospedaliere, al fine di condividere, tra microbiologi e clinici delle diverse discipline specialistiche chiamati a gestire infezioni polmonari, i criteri di scelta dell'approccio di diagnosi eziologica, concordando le modalità preanalitiche relative al prelievo, alla conservazione ed all'invio dei campioni biologici, specificando le modalità analitiche delle indagini di laboratorio e definendo i criteri di refertazione degli esami microbiologici, con la stesura di un protocollo diagnostico, e di consentirne la declinazione operativa, poi, nelle diverse realtà locali. I paragrafi relativi alla parte eziologica sono trattati strettamente secondo un approccio di microbiologia sistematica.
Non vengono, al contrario, affrontati gli aspetti diagnostici della tubercolosi e delle altre patologie da *Mycobacterium* spp. nonché quelli da SARS-CoV-2. Analogamente, le modalità diagnostiche delle infezioni polmonari ad eziologia fungina e parassitaria sono descritte analiticamente in altri documenti. Per tali aspetti si rimanda agli specifici percorsi diagnostici AMCLI.

Hanno contribuito alla revisione del percorso diagnostico relativo alla gestione delle "polmoniti ospedalizzate" i colleghi dei Comitati di Studio e dei Gruppi di Lavoro dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani: Comitato di Studio per gli Antimicrobici (CoSA), Comitato di Studio per la Micologia (CoSM); Comitato di Studio per la Parassitologia (CoSP), Gruppo di Lavoro per le infezioni nel trapianto (GLAIT), Gruppo di Lavoro per le infezioni virali respiratorie (GLIVIRE), Gruppo di Lavoro per le infezioni nel paziente critico (GLIPAC), Gruppo di Lavoro per le infezioni correlate all'assistenza e dei dispositivi impiantabili (GLICADI), Gruppo di Lavoro per l'aggiornamento dei criteri di standardizzazione dell'antibiogramma (GLACSA), Gruppo di Lavoro per la Fibrosi Cistica (GLAFICI), Gruppo di Lavoro per lo sviluppo professionale continuo dei tecnici di laboratorio (GLATELAB), Gruppo di Lavoro per lo studio delle infezioni nelle Residenze Sanitarie Assistite e Strutture Territoriali Assimilabili (GLISTER), Gruppo di Lavoro sulle antropozoonosi (GLAZOO), Gruppo di Lavoro *One Health* (GLONE), Gruppo di Lavoro organizzativo dei percorsi diagnostici (GLOPD). Hanno, inoltre, collaborato i colleghi clinici indicati dalle Società Scientifiche che hanno risposto all'invito: Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO), Federazione delle Associazioni dei Dirigenti Ospedalieri Internisti (FADOI), Gruppo Italiano per la *Stewardship* antimicrobica (GISA), Società Italiana Multidisciplinare per la Prevenzione delle Infezioni nelle Organizzazioni Sanitarie (SIMPIOS), Società Italiana di Pediatria (SIP), Società Italiana di Pneumologia (SIP-IRS) e Società Italiana di Terapia Antinfettiva (SITA).

Bibliografia essenziale

- Magill SS, Klompas M, Balk R, et al. Developing a new, national approach to surveillance for ventilator-associated events. *Crit Care Med* 2013 Nov; 41: 2467-2475.
- Pena-Lopez Y, Ramirez-Estrada S, Rello J. Ventilator-associated events: definitions and uses. Encyclopedia of Respiratory Medicine, 2nd edition, Vol 5, 523-529.
- Woodhead M, Blasi F, Ewig S et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. Full version. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 (S1): E1-E59.

B. LE POLMONITI COMUNITARIE

Le infezioni acute delle vie respiratorie rappresentano un problema sanitario di grande rilevanza in quanto costituiscono, ad oggi, una delle maggiori cause di morbilità, di mortalità e di ospedalizzazione in tutti i Paesi del mondo. Ubiquitarie, colpiscono soggetti di qualsiasi età, potendosi presentare più volte nell'arco della vita. Sebbene le infezioni del tratto respiratorio siano solitamente autolimitanti, esse rappresentano - secondo i dati dell'OMS - mediamente il 13% delle cause di morte dopo i 55 anni di età. Negli individui ad alto rischio (soggetti con patologie croniche) e nei bambini molto piccoli possono, inoltre, sovrapporvisi gravi complicanze con aumento del numero e della durata delle degenze ospedaliere e dei decessi.

Caratteristicamente le CAP si manifestano con la comparsa di febbre associata a segni e sintomi respiratori (tosse, espettorazione, dispnea, e rumori patologici all'auscultazione toracica che tuttavia si contraddistinguono per sensibilità e specificità non elevate) variabili a seconda della gravità e dell'evoluzione del quadro clinico. Deve essere, inoltre, segnalata la possibile insorgenza di complicanze quali sepsi, insufficienze organiche multiple e riacutizzazioni di preesistenti comorbilità. In altri casi l'infezione polmonare, in forma di ascesso polmonare, accompagnato o meno ad empiema pleurico, può rappresentare espressione di un coinvolgimento metastatico di infezioni disseminate (ad esempio in corso di endocardite).

Da un punto di vista epidemiologico, *Streptococcus pneumoniae* è ancora il patogeno più rilevante, rappresentando negli Stati Uniti di America più del 15% di tutti i casi ed il 27% dei casi a livello globale, ed essendo la causa di oltre il 50% dei decessi per polmonite a livello mondiale. Il tasso complessivo di infezioni confermate da *S. pneumoniae* negli USA è compreso tra 5,16 e 6,11 casi/100.000 adulti, con un tasso di 36,4/100.000 per le persone di età superiore ai 65 anni e di 34,2/100.000 per i bambini di età inferiore a 1 anno. Tale dato risente in modo sostanziale della disomogeneità dei criteri e delle tecniche diagnostiche.

Una molteplicità di agenti infettivi, di natura virale e batterica, circola nella popolazione umana determinando infezioni respiratorie nel periodo compreso tra ottobre ed aprile. In altri periodi stagionali, forme respiratorie per lo più causate dai cosiddetti patogeni respiratori atipici (come ad esempio *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae* e *Legionella* spp.) occupano – in un'ipotetica *top ten* delle eziologie – le posizioni di immediato rincalzo. Analogo è il significato anche di *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus* che possono complicare pregresse e concomitanti infezioni polmonari virali o sostenute da microbi atipici.
Circa il 10% delle CAP ospedalizzate richiedono un ricovero in reparti di terapia intensiva (TI), soprattutto per forme sostenute da *S. pneumoniae* e *Legionella* spp.

Analoga attenzione meritano le infezioni virali che sono responsabili, nelle varie casistiche, del 30-40% delle CAP che richiedono ospedalizzazione e che possono essere

sostenute da un elevato numero di agenti: virus dell'influenza A e B, virus respiratorio sinciziale (RSV), rinovirus (HRV), coronavirus (hCoV), metapneumovirus (hMPV), virus parainfluenzali (hPIV), adenovirus (AhAdV), enterovirus (EV), virus del morbillo. Particolare attenzione meritano quelle sostenute da RSV e da HRV, che non raramente si rendono responsabili di ricovero in reparti intensivistici pediatrici o per adulti. Non raramente è possibile osservare l'insorgere di coinfezioni virus-virus, virus-batterio (tipiche quelle tra i virus influenzali e *S. pneumoniae* oppure *S. aureus* oppure *H. influenzae*) o virus-micete filamentoso (virus influenzali ed *Aspergillus* spp.; SARS-CoV-2 ed *Aspergillus* spp. oppure zigomiceti).

Non molte sono, a livello internazionale, le revisioni di linee guida operate a far corso dal 2010 dalle società scientifiche nazionali. Si citano, ad esempio, quelle della *Lebanese Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology* (2014) o della *South African Thoracic Society* (2020), e internazionali quali quelle del consorzio tra *European Respiratory Society, European Society of Intensive Care Medicine, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* e la *Latin American Thoracic Association* (2023) o ancora dell'*American Thoracic Society* e la *Infectious Diseases Society of America* (2019).
Molti studi coordinati dalle maggiori società scientifiche nel corso degli ultimi anni hanno definito i principali fattori di rischio responsabili di un decorso complicato delle CAP in età pediatrica e nell'adulto: *British Thoracic Society* (BTS, 1987-2011), *American Thoracic Society* (ATS, 1993 e 2001), *Pneumonia Patient Outcomes Research Team* (PORT, 1997), *Infectious Diseases Society of America* (IDSA, 2007), *Canadian Infectious Diseases Society* e *Canadian Thoracic Society* (CIDS/CTC, 2000). L'ATS ha suddiviso i pazienti in quattro gruppi sulla base del luogo di cura, della coesistenza di malattie cardio-polmonari e dei fattori "modificanti", la cui valutazione, associata – su base epidemiologica – al profilo di antibiotico-sensibilità, consente la correttezza dell'approccio clinico in merito alla scelta del luogo di cura (domicilio o ospedale) e dello schema terapeutico.

Gli *Scoring Rules* (SR) maggiormente usati e proposti dalle società scientifiche internazionali sono il

- PSI o "*Pneumonia Severity Index*" proposto da Fine MJ nel 1997;
- "*Modified American Thoracic Society Rule* (mATS)" basato sui criteri ATS di polmonite severa;
- "CURB 65" ed il CRB-65, di più recente introduzione, basati su alcuni segni e sintomi (confusione mentale, frequenza respiratoria, pressione arteriosa sistolica e diastolica, azotemia ed età) indicativi della severità della malattia rispettivamente per i pazienti in ambito ospedaliero e territoriale: essi valutano indicatori clinici di gravità dei pazienti in ambito ospedaliero e territoriale, rispettivamente definendo la ripartizione dei pazienti in classi di rischio associate a punteggi riassuntivi delle probabilità prognostiche;
- CURXO, lo SMART-COP ed il CAP-PIRO.

In generale, tutti gli SR menzionati sono relativamente attendibili solo se validati su una popolazione di pazienti sufficientemente numerosa. L'applicazione dei criteri minori (i *minor criteria* delle Linee-guida IDSA/ATS) ha dimostrato un buon potere predittivo in alcuni studi retrospettivi. I criteri su cui sono basati gli SR *CURXO* e *SMART-COP* sono simili ai criteri DSA/ATS. Nessuno di questi criteri di severità, quando applicato in studi prospettici, si è dimostrato capace di buon potere predittivo per evitare un ritardo di trasferimento in terapia intensiva o come indicatore di bassa mortalità.

In effetti, gli *score* che monitorano la gravità della malattia come il CURB 65, o modelli prognostici come il PSI, possono essere usati soprattutto per identificare pazienti con CAP a basso rischio di mortalità e dunque candidati ad un trattamento domiciliare.

Tenendo conto che, ad una valutazione "obiettiva" basata su criteri "ben codificati", occorre associarne una che includa anche parametri soggettivi, come la capacità di assumere farmaci per via orale o la disponibilità di risorse economiche e sociali tali da permettere, da parte del paziente, una corretta gestione domiciliare della malattia. La gestione "domiciliare" della malattia in questi soggetti permette un più facile e rapido ritorno alla normale attività lavorativa, evitando inoltre l'aumentato rischio di eventi tromboembolici connesso all'ospedalizzazione, e la possibile superinfezione da germi ospedalieri. Più complessa è l'identificazione dei pazienti con CAP "severa" che rende necessario il ricovero in reparti di Terapia Intensiva. Il "*Modified American Thoracic Society Rule* (mATS)", il CURB ed il PSI (*class* V) non sono stati validati, singolarmente, come *test* decisionali per un ricovero in reparti di Terapia Intensiva dimostrandosi poco specifici. Recentemente, però, l'insieme dei criteri ATS e delle variabili del CURB sono stati considerati come criteri minori per una diagnosi di "polmonite severa", dovendosi associare a due criteri maggiori, cioè la presenza di *shock* settico richiedente l'uso di vasopressori e/o una grave insufficienza respiratoria richiedente intubazione e/o procedure di ventilazione meccanica.

Si è inoltre sempre più diffuso il ricorso a *markers* biologici che possono essere d'ausilio per il medico che gestisce una CAP nella decisione di ricoverare il paziente rispetto alla scelta di una gestione domiciliare, come pure nella scelta di optare per terapie somministrate per via infusiva o eventualmente di passare a terapie orali.
Generalmente le forme di CAP sono trattate con beta-lattamici (ad esempio: amoxicillina o amoxicillina+clavulanato), fluorochinoloni, macrolidi o con terapie di combinazione con questi antibiotici.

Le infezioni virali delle basse vie respiratorie (LRVI) sono una causa significativa di morbosità e mortalità in tutto il mondo, rappresentando un'importante sfida per la salute globale (WHO, 2013). I virus respiratori sono gli agenti eziologici nel 20-40% dei casi di CAP negli adulti e nel 50% circa nei bambini, come descritto anche dallo *Pneumonia Etiology Research for Child Health* (PERCH) *Study Group* (2019). Con l'arrivo della recente pandemia da SARS-CoV-2 il ruolo dei virus respiratori nel causare infezioni polmonari gravi come la polmonite è diventato ancora più rilevante. Tra le complicanze più importanti vi è la sindrome da *distress* respiratorio acuto (ARDS) che richiede ricovero in terapia intensiva ed è gravata da un'elevata mortalità.
L'elevata capacità di diffusione dei virus respiratori in genere (e dei virus influenzali A e B in particolare), la loro potenziale aggressività nei pazienti defedati e la disponibilità sia di strumenti diagnostici rapidi sia di terapie farmacologiche specifiche pone l'accento sulla necessità di monitorare queste infezioni in reparti di terapia intensiva, medicina interna, pneumologia, geriatria e pediatria, ponendo in essere tutti i necessari presidi di prevenzione e/o contenimento delle infezioni.

La coinfezione batterica o fungina/virale è un fattore di rischio ben definito per esiti sfavorevoli nella polmonite grave. Il rischio di esiti peggiori è ancora maggiore in caso di diagnosi ritardata. Sebbene le tecniche di ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO) si siano affermate come strumento terapeutico per la gestione della LRVI grave, la loro efficacia e le indicazioni non sono ancora completamente definite. Inoltre, solo pochi Centri dispongono delle risorse necessarie per l'esecuzione di questa metodica.

B1. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE IN ETÀ NEONATALE E PEDIATRICA

I virus sono di gran lunga i microrganismi più comunemente in causa: sono attualmente noti più di 300 tipi e sottotipi virali differenti, correlati ad infezioni respiratorie. L'esistenza in natura di una vasta riserva di animali infetti da virus (quali quelli appartenenti alle famiglie *Orthomyxoviridae* e *Coronaviridae*) che possono potenzialmente superare le barriere della specie ospite, può determinare il verificarsi di epidemie da ceppi emergenti con salto di specie.

I virus coinvolti nella eziologia delle polmoniti appartengono alle famiglie *Orthomyxoviridae* (genere: *Influenzavirus* A, B e C), *Paramyxoviridae* (genere *Respirovirus: Human parainfluenza virus* tipo 1 e 3; genere *Rubulavirus*: *Human parainfluenza virus* tipo 2, 4; virus della parotite; genere *Morbillivirus*: virus del morbillo), *Pneumoviridae* (genere *Orthopneumovirus*: *Human Respiratory Syncytia*l Virus, RSV; genere *Metapneumovirus*: *Human Metapneumovirus*, hMPV); *Picornaviridae* (genere *Enterovirus: Human enterovirus* A-D come Coxsackievirus A e B, Echovirus, Enterovirus 68-71, 104, 117;e *Human Rhinovirus* A, B e C; genere *Parechovirus: Human parechovirus*), *Adenoviridae* (genere: *Mastadenovirus*), *Parvoviridae* (genere: *Bocavirus*, hBoV) e *Coronaviridae* (*Coronavirus*: 229E, OC43, NL63 e HKU1, SARS, MERS), sebbene il loro ruolo, almeno per alcuni, sia ancora da stabilirsi con certezza. Anche virus di recente identificazione (*Bocavirus*) sembrano essere occasionalmente coinvolti in patologie respiratorie acute.

Secondo il rapporto *Global Burden of Disease* (GBD) relativo al 2017, l'RSV e il virus influenzale di tipo A hanno causato 24,8 e 39,1 milioni di episodi di LRVI a livello globale, rappresentando rispettivamente la quarta e la seconda causa di LRVI. Nel mondo RSV e virus influenzale A hanno causato rispettivamente circa 769 mila decessi, di cui il 53% in bambini di età ≤5 anni, e circa 58 mila decessi, di cui il 13% in bambini di età ≤5 anni.
L'infezione da RSV si presenta con andamento epidemico nel periodo invernale (acme in dicembre-febbraio) manifestandosi con quadri di bronchiolite acuta, con incubazione breve (2-4 giorni) nel bambino di età compresa tra 1 mese ed 1 anno e con un picco di incidenza massimo tra 2 e 7 mesi. Un terzo dei casi si osserva in bimbi prematuri (quelli nati dopo solo 33 settimane di gestazione presentano un rischio fino a cinque volte maggiore rispetto a quelli nati a termine) o comunque immunocompromessi, in neonati con malformazioni congenite, con fibrosi cistica o con broncodisplasia. All'esordio di tipo rinitico fa seguito il coinvolgimento dell'albero respiratorio inferiore (bronchioli terminali e respiratori). Tra i neonati infettati da RSV il 40% presenta il coinvolgimento delle basse vie aeree mentre il 10-20% sviluppa una bronchiolite, con compromissione respiratoria ostruttiva, evidenziata dal segno clinico del cosiddetto *tirage*, rantoli subcrepitanti e sibili infiammatori. Episodi di apnea sono osservati fino nel 20% dei casi, con tassi di mortalità fino allo 0,2% (con picchi pari all'1-3% per i casi ospedalizzati). Oltre alla bronchiolite, RSV si rende responsabile del 5-40% dei casi di polmonite del lattante e del 10-30% dei casi di bronchite asmatica del bambino.

L'infezione da hMPV determina piccole epidemie invernali che spesso si sovrappongono a quelle da RSV, sia dal punto di vista epidemiologico che dell'andamento clinico. Esse rappresentano il 5-10% delle forme respiratorie ad eziologia virale nel bambino ospedalizzato di età inferiore a 2 anni.

Le infezioni da virus parainfluenzali si osservano in autunno, in piccole epidemie irregolari. Tutti i quadri clinici sono possibili, ma più frequentemente si osservano casi di bronchiolite febbrile da *Human parainfluenza virus* di tipo 3 (questo tipo causa il 45% delle forme del bambino e la quasi totalità di quelle del neonato), e di laringotracheiti acute da *Human parainfluenza virus* di tipo 1-4.

In età neonatale si descrive – nell'ambito della possibile sepsi che segue a volte alla colonizzazione – la polmonite da *Streptococcus agalactiae*. In tale età, d'altra parte, va presa in considerazione anche la polmonite da *Listeria monocytogenes*. Oggi di raro riscontro, è la forma clinica connatale caratterizzata da polmonite subacuta interstiziale sostenuta da *Chlamydia trachomatis* a trasmissione verticale.
Fatta eccezione per *Bordetella pertussis*, i batteri sono più raramente descritti quali causa di broncopneumopatia cronica e/o pneumopatia infettiva in età pediatrica: *S. aureus* deve essere tuttavia considerato per le forme del bimbo di età inferiore a 2 anni che presenti immagini bollose all'esame radiologico ed a seguito di episodi di infezione influenzale; *S. pneumoniae* può avere, oltre che in età neonatale, anche in età pediatrica un ruolo eziologico significativo; analogamente, *Neisseria meningitidis* (soprattutto di sierogruppo Y e W135) e *H. influenzae*, di sierogruppo b e non solo, possono raramente ricoprire il ruolo di agenti sovrainfettanti post-influenzali, anche se in meno del 2% dei casi anche a seguito dell'introduzione delle pratiche vaccinali. Le infezioni da *M. catarrhalis* e da *Mycoplasma pneumoniae* si manifestano, in età neonatale e pediatrica, con quadri di polmonite alveolare acuta. Non deve essere trascurata neppure *Chlamydophila pneumoniae* che può presentarsi sia in forma endemica che epidemica soprattutto nei bimbi in età scolare. Si segnalano, d'altra parte, a far corso dalla primavera 2023 numerosi focolai di polmoniti infantili dovuti a *Mycoplasma pneumoniae* in diversi paesi extra-europei (Cina, Corea del Sud) ed europei (Francia, Irlanda, Olanda) talora caratterizzati da un fenotipo di *M. pneumoniae* resistente ai macrolidi.

Bordetella pertussis è responsabile della pertosse, la cui epidemiologia è stata decisamente modificata dall'introduzione di programmi vaccinali con elevata efficacia protettiva e scarsa incidenza di effetti collaterali avversi in età pediatrica. La sua evoluzione consente di distinguere tre periodi consecutivi, assolutamente ripetitivi e patognomonici: l'incubazione rigorosamente muta, la fase di invasione caratterizzata da tosse secca, notturna ma banale e la fase degli accessi di tosse spasmodica seguiti da apnea ed espettorazione. La diagnostica per immagini può evidenziare un addensamento *juxta-ilare* od un'opacità triangolare in sede paravertebrale. Va tuttavia segnalato che, sebbene la pertosse sia meno frequente rispetto al passato, forme similari appaiono oggi sostenute da *Bordetella parapertussis*.

B2. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE IN ETÀ ADULTA

Gli agenti infettivi responsabili di LRTI nei soggetti giovani-adulti appartengono a tutti i *Regna* microbici: in particolare, la parte maggiore dei casi è provocata da batteri e virus.

Casistiche statunitensi rivelano che *S. pneumoniae* è in causa nel 10% dei casi, seguito da *H. influenzae* e da *M. pneumoniae* (quest'ultimo prevale nei soggetti età inferiore ai 50 anni). Frequenze minori si osservano per i casi di infezione da *C. pneumoniae* e da *Legionella* spp., che tuttavia si possono rendere responsabili di limitati episodi epidemici. È opportuno ricordare che le polmoniti causate da *S. pneumoniae* e da *Legionella* spp possono presentarsi con quadri di gravità tale da causare ipossia e/o *shock* settico

condizionanti un ricovero in Terapia Intensiva. Infezioni sostenute da Enterobacterales sono di più raro riscontro.
Un problema di crescente significato epidemiologico e clinico è rappresentato dalla polmonite da *S. aureus*, in particolare quella sostenuta da ceppi con peculiare fenotipo di resistenza alla meticillina (*community acquired* MRSA - CA-MRSA); questi stipiti differiscono a livello genotipico dai ceppi di MRSA acquisiti in ospedale perché possiedono cassette geniche SCC_{mec} differenti e poiché più spesso hanno un particolare gene che codifica per una specifica tossina (*Panton-Valentine leukocidin* - PVL). La PVL è un potente fattore di virulenza in grado di determinare infezioni ad andamento necrotizzante. A differenza della classica polmonite di comunità da *S. aureus,* più frequente nelle età estreme della vita (neonati e grandi anziani) le forme sostenute da CA-MRSA privilegiano i soggetti di giovane età, dove determinano una polmonite multifocale con spiccato andamento necrotizzante e quindi con quadri radiologici caratterizzati da multiple aree di addensamento con tendenza all'escavazione.

Mycoplasma pneumoniae può causare fino al 15-60% dei casi di polmonite comunitaria negli adolescenti e nei giovani adulti, anche se la frequenza delle forme clinicamente silenti e la benignità abituale della malattia non consente di valutarne appieno la prevalenza. Dopo un'incubazione di una-tre settimane, il quadro clinico si configura per la presenza di malessere, marcata astenia, febbre, brividi e cefalea, con tosse secca e talora dolori retrosternali. L'esame radiologico evidenzia, per lo più, opacità basali e ilifughe, spesso unilobari.

Chlamydophila pneumoniae può presentarsi sia in forma endemica che epidemica; più frequente nei bimbi in età scolare, colpisce comunque anche soggetti adulti. Studi sieroepidemiologici hanno documentato che negli Stati Uniti, così come in Italia, il 50% dei soggetti di età superiore ai 45 anni presenta anticorpi specifici di tipo IgG. L'infezione acuta decorre frequentemente in modo asintomatico o paucisintomatico. Raramente può determinare quadri clinici di gravità variabile che inizialmente si presentano con sintomi da coinvolgimento delle vie aeree superiori (faringite, sinusite, bronchite). In una piccola percentuale di casi si osserva un quadro di polmonite con sintomi aspecifici, caratterizzato, dal punto di vista radiografico, da una lesione singola, subsegmentale o, nelle forme più gravi, da un'estensione bilaterale con associato versamento pleurico.

Le malattie parassitarie dell'apparato respiratorio sono relativamente difficili da sospettare e da diagnosticare perché le manifestazioni cliniche ed i reperti radiologici non sono sempre specifici. Pertanto, come del resto si verifica per la maggior parte delle patologie parassitarie (causate da protozoi o da elminti), i dati epidemiologici e clinici sono di cruciale rilevanza per porne il sospetto diagnostico. Gli elminti possono coinvolgere le vie respiratorie nelle diverse fasi del loro ciclo vitale. D'altra parte, le infezioni parassitarie che si localizzano a livello del polmone possono essere causa di manifestazioni cliniche specifiche oppure possono essere transitorie e del tutto asintomatiche. Tutti i parassiti che infestano l'uomo potrebbero coinvolgere il polmone: tuttavia, l'infezione parassitaria più comune del sistema respiratorio è la malaria seguita dalla paragonimiasi e dalla cisticercosi. Altre infezioni relativamente frequenti sono l'amebiasi, la toxoplasmosi, l'echinococcosi cistica (circa il 20% di tutte le localizzazioni dovute a questo patogeno), l'echinococcosi alveolare e la schistosomiasi.

Parassiti che invece più raramente, se non eccezionalmente, possono causare quadri infiammatori e/o ascessi polmonari includono *Cryptosporidium* spp. (nella criptosporidiosi disseminata), *Leishmania* spp., *Gnathostoma spinigerum* (gnatostomiasi),

Strongyloides stercoralis (nella strongiloidiasi disseminata), *Trichinella* spp. e *Paragonimus* spp. Lesioni focali non cistiche si verificano nella malattia di *Chagas* o tripanosomiasi americana (*Trypanosoma cruzi*), nella toxocariasi (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*), nella paragonimiasi (*Paragonimus* spp.), nella sparganosi (*Spirometra* spp.) e, infine, nella filariasi (*Dirofilaria* spp., *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*). Le lesioni cistiche si possono riscontrare nella cenurosi (*Taenia multiceps*), quelle emorragiche o ischemiche possono essere causate da *G. spinigerum* (gnatostomiasi), da *S. stercoralis* (strongiloidiasi disseminata) e da *T. spiralis* (trichinellosi).

Per quanto riguarda i pazienti critici con CAP, i *test* molecolari *multiplex* nella pratica clinica hanno permesso una descrizione più accurata del ruolo dei virus respiratori nell'eziologia di questa malattia. Secondo i dati disponibili, i virus respiratori sono agenti eziologici del 15-45% dei casi di CAP in pazienti critici. Dati di letteratura indicano che solo il 40% dei pazienti con CAP è sottoposto a *test* per i virus respiratori (46% durante la stagione influenzale) mentre per i pazienti con HAP la percentuale cala al 13%. I pazienti con più comorbidità e quelli con proteina C-reattiva (PCR) elevata e grave leucopenia sono stati sottoposti più frequentemente a *test* per indagini virologiche, indipendentemente dalla stagione. Van Someren *et al*. riportano che durante la stagione influenzale la frequenza di rilevazione dei virus influenzali era del 14% nei pazienti con CAP testati e del 10% nei pazienti con HAP. Lo studio retrospettivo di Zhang *et al*. (2020), che ha analizzato la presenza di virus respiratori in campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) di pazienti con CAP non rispondente alle cure, ha rilevato un'infezione virale nel 47% di questi casi, con l'influenza e gli AhDv come patogeni identificati più frequentemente. Non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda i dati clinici e di laboratorio tra casi virali o non virali di CAP non rispondente alla terapia antibiotica. Tuttavia, la presenza di opacità a vetro smerigliato combinate con consolidamento alla tomografia computerizzata (TC) è risultata specifica per la CAP virale non rispondente alla terapia.

Prima della pandemia da COVID-19, il virus influenzale era riconosciuto come causa principale di polmonite virale. Infatti, lo studio di van Asten (2020) di modellazione della regressione su serie temporali ha riportato che fino al 12% dei ricoveri annuali per *Severe Acute Respiratory Infections* (SARI) nelle unità di Terapia Intensiva degli adulti è associato all'infezione con virus influenzale. Tuttavia, esistono ampie variazioni da un anno all'altro, con un peso relativo delle infezioni influenzali nelle SARI più elevato durante le epidemie influenzali. Tra il 2007 e il 2016, l'incidenza dei ricoveri in unità di terapia intensiva dovuti a SARI variava da 0,40 a 1,71/10000 abitanti/anno, con una mortalità tra il 13% e il 20% (Van Asten, *et al*., 2020). I virus dell'influenza stagionale A/B possono essere classificati come segue: il virus dell'influenza A ha i sottotipi A/H3N2 e A/H1N1, mentre il virus dell'influenza B ha i lignaggi B/Victoria e B/Yamagata. Negli ultimi 100 anni si sono verificate quattro pandemie influenzali: 1918 (H1N1) con circa 50 milioni di morti; 1957 (H2N2) con quasi 1,1 milioni di morti; 1968 (H3N2) con circa 1 milione di morti; e 2009 (H1N1) con una stima di 575 mila morti. Secondo il rapporto *Global Burden of Disease* (GBD) relativo ai dati del 2017, il tasso di ricoveri ospedalieri dovuti a LRTI causati da virus influenzali è stato di 123,8 casi per 100.000 abitanti, mentre il numero di decessi annuali attribuibili variava da circa 99.000 a 200.000. Inoltre, secondo i dati forniti dai *Centers for Disease Control and Prevention* statunitensi e dalla *World Health Organization* (WHO), fino a 650.000 decessi a livello globale sono dovuti all'influenza stagionale. I pazienti con infezione influenzale grave possono presentare dispnea progressiva, spesso secondaria ad un danno alveolare diffuso, nonché polmonite

bilaterale e complicazioni come miocardite e ARDS. Circa il 10% dei pazienti ospedalizzati con infezione influenzale richiederà il ricovero in terapia intensiva, soprattutto a causa dell'insufficienza respiratoria acuta in coloro che presentano polmonite virale (circa il 70% dei pazienti critici ricoverati con insufficienza respiratoria), con un tasso di mortalità associato del 20%.

Lo *screening* per l'infezione da virus influenzale è raccomandato nei pazienti ospedalizzati che presentano segni o sintomi compatibili con un'infezione respiratoria virale durante la stagione influenzale. Lo *screening* al di fuori della stagione è raccomandato nei casi di possibili legami epidemiologici, come focolai o viaggi recenti in aree in cui è in corso la stagione influenzale. Come indicato dalle linee guida dell'IDSA/ATS, l'enfasi dovrebbe essere posta in particolare sui gruppi a più alto rischio di complicanze, tra cui i bambini più piccoli, gli anziani, le donne in gravidanza, le persone con comorbidità croniche e gli individui immunocompromessi. Lo studio osservazionale di Pronier *et al*. (2021) ha valutato la carica virale del virus dell'influenza in campioni respiratori ottenuti da 105 pazienti ricoverati in terapia intensiva con infezione influenzale, di cui 59 (56%) con ARDS. Cariche virali più elevate nei campioni respiratori sono risultate correlate ad un aumento del rischio di mortalità. Una grave infezione influenzale può anche predisporre il 30-50% dei pazienti adulti a infezioni batteriche secondarie, con *S. pneumoniae* e *S. aureus* come patogeni batterici più frequentemente rilevati. La gravità e gli esiti dell'infezione influenzale sono determinati da fattori legati al ceppo causale, all'ospite (comorbidità e risposta infiammatoria) e all'ambiente. Circa il 20-30% degli adulti ricoverati con infezione influenzale richiederà il ricovero in terapia intensiva; inoltre, fino al 50% richiederà la ventilazione meccanica a causa della polmonite virale e dell'ARDS e dovrà far fronte a una mortalità associata che può raggiungere il 25%. I pazienti a maggior rischio di polmonite influenzale grave sono i bambini di età inferiore a 5 anni, gli adulti di età superiore a 65 anni, i residenti in case di cura, le donne in gravidanza e i soggetti immunosoppressi o con comorbidità croniche. Negli studi su pazienti con influenza con alti tassi di adeguato *work-up* micologico, l'incidenza dell'aspergillosi polmonare associata all'influenza (IAPA) è di circa il 20%. Le cause di questa problematica risiedono in una "*down regulation*" di diversi geni che codificano per proteine con funzioni di opsonizzazione, riconoscimento e uccisione dei conidi nei pazienti con IAPA rispetto a quelli della sola influenza.

I dati disponibili fino ad ora mostrano come i virus non influenzali causano tra il 25% e il 30% delle LTRI (dati precedenti alla pandemia COVID-19). Rimane controverso se l'impatto dei virus non influenzali sulla gravità, le complicanze e gli esiti dei pazienti immunocompetenti con CAP sia simile a quello del virus influenzale. Zhou *et al*. (2019) in uno studio retrospettivo hanno rilevato che il 27% di 2.336 casi di polmonite virale negli adulti era causato da virus non influenzali, con RSV, adenovirus e coronavirus come virus più frequentemente rilevati. Le complicazioni durante l'ospedalizzazione, come la sepsi (40,1 *vs* 39,6%; *p*=0.890) e l'ipossiemia (40,1 *vs* 37.2%; *p*=0,449), erano simili tra i gruppi con infezione da virus influenzali e non influenzali: in un campione di 915 pazienti, non sono state osservate differenze statisticamente significative per quanto riguarda la mortalità intraospedaliera (2.8 *vs* 0,4%; *p*=0,062) ed a 90 giorni (3,8 *vs* 1,7%; *p*=0,174). In un altro studio retrospettivo Chen *et al*, (2019) hanno analizzato i dati di 1.420 casi di polmonite virale (963 casi di polmonite da influenza A, 386 casi di polmonite da influenza B e 341 da virus non influenzali) e hanno riscontrato che i pazienti con polmonite da virus influenzale avevano percentuali più elevate di insufficienza respiratoria (23 *vs* 14%, *p* =0,001,), insufficienza cardiaca (25 *vs* 14%, *p*=0,001), *shock* settico (8 *vs* 3%, *p*=0,002),

ricovero in terapia intensiva (22 *vs* 9%, *p*=0,001) e mortalità a 30 giorni (19 *vs* 9%, *p*=0,001) rispetto ai pazienti con polmonite non influenzale. La polmonite da virus influenzale B e la polmonite non influenzale sono state associate ad un minor rischio di mortalità a 30 giorni. È interessante notare che in uno studio prospettico non recente, ma sicuramente uno dei meglio disegnati, siano state confrontate da Choi *et al*. (2015) le caratteristiche cliniche e gli esiti tra i pazienti con polmonite grave da rinovirus e polmonite grave da influenza. Con i limiti delle analisi per sottogruppi, i pazienti con polmonite grave da rinovirus erano più frequentemente immunocompromessi (81 *vs* 33%, *p*=0,09) e presentavano meno spesso coinfezioni batteriche (18 *vs* 37%, *p*=0,09) e *shock* settico (30 *vs* 55%, *p*=0,03) rispetto ai pazienti con polmonite grave da influenza. Inoltre, la mortalità a 28 giorni era elevata e i tassi erano simili nei due gruppi (30 *vs* 35%, *p*=0,61).

B3. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE IN ETÀ GERIATRICA

Tra i soggetti di età compresa tra i 60 ed i 90 anni le infezioni respiratorie sono frequenti. Circa il 90% di tutti i decessi per polmonite ed influenza si verificano fra individui di 65 anni o più.
In particolare, in questa fascia di età, i pazienti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) non raramente presentano episodi di sovrainfezione batterica acuta, sostenuta sia da cocchi Gram positivi, quali *S. aureus* e *S. pneumoniae* (33%), sia, con maggiore rilevanza epidemiologica (67%), da batteri Gram negativi (*H. influenzae, P. aeruginosa* ed Enterobacterales). In accordo con i criteri di Antohonisen, un antibiotico dovrebbe essere prescritto - in caso di riacutizzazione di BPCO - quando fossero presenti tutti i tre seguenti sintomi: incremento della dispnea, aumento della quantità dell'espettorato e riscontro di purulenza. Questa affermazione è stata recentemente confermata da una recente "*Cochrane review*" in cui gli autori concludono che un trattamento antibiotico ha effetti benefici nei pazienti che, affetti da BPCO moderata/severa, presentano un incremento della tosse e della purulenza dell'espettorato.

Le forme da *M. catarrhalis* conseguono ad un'affezione respiratoria predisponente e sul piano semeiologico non si contraddistinguono per aspetti patognomonici; tuttavia, queste forme sono caratterizzate dalla frequente dissociazione tra l'impegno clinico e la risoluzione rapida delle alterazioni radiologiche. La presentazione clinica, non raramente senza febbre, si caratterizza spesso per una marcata tachipnea.
Nell'anziano defedato, spesso sottoposto a trattamenti farmacologici complessi potenzialmente includenti anche antidepressivi, ansiolitici e ipnoinducenti, frequenti sono le polmoniti *ab ingestis* favorite da disturbi della deglutizione e dalla cattiva igiene orale: le patologie croniche del cavo orale favoriscono la colonizzazione batterica con successivo passaggio di microrganismi nelle basse vie aeree per fenomeni microaspirativi.

Particolare attualità riveste la *Nursing Home Acquired Pneumonia* (NHAP), prima fra le infezioni correlate all'assistenza (ICA) tra gli ospiti delle strutture di lungodegenza in base agli studi di prevalenza puntuale italiani HALT-3 (2016-17) e HALT pilota 2022. È questa la patologia per la quale più comunemente viene richiesto il trasferimento all'ospedale per acuti. Le infezioni delle vie respiratorie nelle LTCF sono passate dal 36,6% (HALT-3; 2016-17 IT) al 40,6% del totale delle ICA [HALT pilota 2022 maggio-luglio 2022, con una prevalenza di 1,27/100 ospiti, comprendendo COVID-19 asintomatico (COV-ASY:12,5%), COVID-19 lieve/moderato (COV-MM=18,8%) ed altre infezioni delle basse vie].

In generale, la prevalenza di polmonite ed influenza sembra differire tra residenti a permanenza "breve" e "prolungata". Fattori di rischio comuni includono: età avanzata (>85 anni), provenienza da un ospedale per acuti, particolari condizioni cardiovascolari e respiratorie, stato funzionale compromesso ed assunzione di antibiotici o farmaci inappropriati. Le polmoniti contratte in *Nursing Home* oppure in *Long-Term Care Facilities* (LTCFs), presentano elementi comuni con quelle contratte in ospedale per la tipologia dei soggetti residenti, la distribuzione dei germi responsabili e la prevalenza, nel nostro Paese, di batteri multiresistenti (MDR), quali MRSA, *S. pneumoniae* penicillino-resistente, e soprattutto enterobatteri ESBL o carbapenemasi-produttori, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. MDR. Le caratteristiche del microrganismo responsabile, con la variante di fattori ambientali che possono essere diversi da istituto a istituto, e le condizioni cliniche di base del paziente rendono ragione di un tasso di mortalità media superiore al 30% caratterizzato da un incremento progressivo nel tempo essendo del 19% al quattordicesimo giorno, del 59% a 12 mesi e del 75% a 2 anni. Questo dato è attribuito al peggioramento dell'autonomia e al progressivo e più rapido declino funzionale che segue l'episodio di polmonite.

Nel paziente anziano a domicilio le eziologie virali sono frequenti nei casi di rinite, faringolaringite, polmonite anche dispnoica (fino al 43% in talune casistiche). L'infezione da RSV è frequentemente descritta, mentre ai *Rinovirus* umani di tipo A e B è attribuito il 24% dei casi, ai *Coronavirus*: 229E e OC43 il 12% dei casi, ai virus influenzali A e B ed ai virus parainfluenzali ed agli adenovirus rispettivamente il 4% e l'1% dei casi, soprattutto nei mesi invernali. Nei soggetti istituzionalizzati è possibile osservare un'evoluzione di tipo epidemico. Fattori predisponenti sono concomitanti situazioni di insufficienza respiratoria cronica ostruttiva.

Secondo il rapporto *Global Burden of Disease* (GBD) del 2019, RSV e il virus influenzale di tipo A sono stati riscontrati quali agenti eziologici di polmonite nel 29% di individui con età >70 anni, con una mortalità associata del 41%.
I segni clinici non sono specifici, pur osservandosi dispnea nel 65% e polmonite nell'82% dei casi da RSV. L'infezione esordisce con un quadro di rinite che evolve con la comparsa di tosse (90-97% dei casi), di sibili e di febbre (50% dei casi). Le forme da RSV possono complicarsi con sovrainfezioni batteriche fino al 55% degli episodi, determinando un tasso di mortalità elevato (10% medio). Analogamente a quanto riferito per RSV, anche i rinovirus umani di specie A, B e C ed i virus influenzali di tipo A e B sono descritti fino al 12% dei casi di pneumopatie infettive che necessitano del ricovero in reparti di Terapia Intensiva. Il tasso di mortalità è del 3-5% nei soggetti istituzionalizzati e del 10-20% in quelli ospedalizzati.

B4. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE NEL SOGGETTO CON "PATOLOGIE STRUTTURALI DEL POLMONE"

Categoria a sé è quella dei soggetti con patologie strutturali del polmone, tra le quali la forma più significativa è la fibrosi cistica (FC). Anche i soggetti con bronchiectasie non-fibrosi cistica quali la sindrome di Kartagener sono, tuttavia, assimilabili al paziente con fibrosi cistica in termini patogenetici, sebbene epidemiologicamente il rischio di infezioni sia minore. Tra questi devono essere inclusi i portatori di forme franche di *immotilia cilia* oppure quelli per i quali non è possibile evidenziare un nesso causale o patogenetico con patologie ciliari o altre patologie congenite. Alcuni di questi pazienti sono bambini con riscontro di polmoniti ricorrenti o con storia di asma sin dalla prima infanzia, altri sono adulti spesso broncopatici cronici in trattamento prolungato cortisonico per via inalatoria.

A causa di un difetto congenito del *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), la fibrosi cistica si caratterizza per l'alterato trasporto di ioni, l'eccessiva produzione di muco, la comparsa di infiammazione e l'anomala adesività microbica: l'accresciuta produzione di muco denso e disidratato, infatti, previene la *clearance* dei microrganismi che si moltiplicano all'interno delle vie aeree che, infette ed infiammate, cronicamente evolvono in una condizione di insufficienza respiratoria in cui la crescita batterica in forma di *biofilm* comporta l'impossibilità pratica dell'eradicazione microbica. La colonizzazione batterica è associata ad un progressivo deterioramento della funzionalità respiratoria, ad un peggioramento delle condizioni generali, che portano il paziente a morte (20% dei pazienti nell'arco di un anno). L'aspettativa di vita è notevolmente migliorata dal riconoscimento della malattia - nel 1938 era di 2 anni - essendo oggi superiore a 40 anni. *Haemophilus influenzae* e *S. aureus* (anche MRSA) sono i primi colonizzanti in età pediatrica (rispettivamente nel 31, 72% e 7,8% dei casi), mentre *P. aeruginosa* segue nell'adolescenza convertendosi nelle forme "mucoide" e "nana" (*dwarf*), detta anche "*Small Colony Variants*" (SCV), per rappresentare poi fino al 59% di tutti i microrganismi isolati. Gli streptococchi viridanti commensali dell'orofaringe sembrano esercitare un effetto protettivo rispetto alla colonizzazione da *P. aeruginosa*: poiché questi microrganismi risentono delle terapie antibiotiche prescritte per il trattamento di *S. aureus*, si sottolinea l'importanza della necessità di trattare le infezioni valutando con attenzione le colonizzazioni asintomatiche.

Il complesso *Burkholderia cepacia* è patogeno meno frequente (3%, soprattutto tra gli adolescenti ed i giovani adulti) ma assolutamente impegnativo dal punto di vista terapeutico e prognostico (è letale nel 20%): *B. cenocepacia* soprattutto, ma anche *B. multivorans*, esercita un ruolo patogeno certo, mentre è riconosciuto probabile quello di *B. cepacia*, e possibile quello di *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria* e di *B. gladioli*. *Stenotrophomonas maltophilia* ed *Achromobacter xylosoxidans* sono associati all'uso di antibiotici in adolescenti ed adulti (8%). Altri batteri, quali *Ralstonia pickettii*, *Alcaligenes* spp, *Pandoraea apista* e *Inquilinus limosus*, sono di isolamento occasionale e di significato incerto.

Occorre tenere in considerazione, sia dal punto di vista della frequenza di riscontro (9%) sia per il significato clinico, il ruolo dei micobatteri non tubercolari inclusi nel *Mycobacterium avium complex* ovvero di quelli a rapida crescita come *M. abscessus*. Quest'ultimo, colonizzante potenziale per lunghi periodi unitamente ad altri microrganismi, può instaurare in modo improvviso una condizione, potenzialmente letale, di monocolonizzazione.

I soggetti affetti da fibrosi cistica, infine, sono predisposti ad infezione da miceti filamentosi jalini quali *Aspergillus* spp. (si rileva nel 10% dei casi), *Rasamsonia argillacea* e *Scedosporium aurantiacum*, e dematiacei (*Lomentospora prolificans*) in tutte le classi di età, mentre certo è il ruolo patogeno di RSV in età pediatrica e dei virus influenzali verosimilmente in tutte le classi d'età.

B5. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE NEL SOGGETTO VARIAMENTE IMMUNODEPRESSO

Si considerano condizioni diverse di immunodepressione, patologica (diabete mellito non controllato; immunodeficienze congenite od acquisite; malattie oncoematologiche maligne) o iatrogena (trapianto di cellule staminali emopoietiche, trapianto d'organo solido, terapie steroidee ad alte dosi, con immunosoppressori, antiblastici, anticorpi anti-

B-linfociti o anti-TNF come infliximab ed etanercept). Pertanto, sia il grado che il tipo di immunodepressione sono da considerarsi come estremamente eterogenei.
Il paziente immunodepresso è fortemente soggetto a patologie da opportunismo microbico, sostenute da batteri, miceti, virus a seconda del tipo di immunodepressione, in grado di determinare sia malattie con espressività clinica e di *imaging* ben definita sia quadri clinico-radiologici del tutto aspecifici.
Nocardia spp. (*N. abscessus*, *N. cyriacygeorgica*, *N. farcinica*, *N. nova* e *N. otitidiscaviarum* tra le altre), inalata con la polvere, è responsabile inizialmente di localizzazioni polmonari soprattutto in adulti di 60-80 anni (i maschi sono colpiti due volte più che le donne). Fattori predisponenti sono riconosciuti in circa l'80% dei casi: terapie steroidee (35% circa dei casi), trapianti d'organo solido (12%), malattie ematologiche maligne (10%), patologie respiratorie come neoplasie, bronchiectasie, tubercolosi, silicosi, sarcoidosi, asma, BPCO (6%), infezione da HIV (5%). Altre condizioni di modesta immunodepressione che predispongono alla nocardiosi sono le malattie del connettivo, il diabete, l'alcolismo, la tossicomania. La nocardiosi polmonare assume le caratteristiche di pneumopatia cronica di diagnosi difficile in soggetti come i broncopatici cronici con malattia instabile e tendente a frequenti riacutizzazioni, pur potendo evolvere anche in modo rapido. La lesione polmonare – in un contesto di leucocitosi neutrofila e di anemia moderata - presenta aspetti assai polimorfi e poco specifici, fino all'ascesso con tendenza alla progressione.

Parimenti deve essere segnalato il crescente incremento delle micobatteriosi atipiche, sia per l'invecchiamento della popolazione che per il miglioramento dei processi di identificazione microbiologica: le manifestazioni cliniche a livello polmonare si caratterizzano per la comparsa di tre quadri: quello della polmonite da ipersensibilità, quello della patologia tubercolare-simile e, infine, delle bronchiectasie nodulari. Tali quadri si devono porre in diagnosi differenziale con quelli tipici delle polmoniti.

Tra i miceti filamentosi, quelli che presentano particolare tropismo per l'apparato respiratorio sono quelli appartenenti al genere *Aspergillus*. Di più raro riscontro sono le localizzazioni polmonari da *Mucorales*, da miceti dematiacei e da *Scedosporium* spp.
Le aspergillosi (soprattutto da *A. fumigatus* e da *A. terreus*) si caratterizzano per tassi di prevalenza differenti nelle diverse categorie di soggetti a rischio, massimi per i soggetti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche (HSCT) o di organi solidi (in particolare trapianto di polmone, fino al 25%), oggi pressoché vicino a zero nei soggetti con infezione di HIV. Emergente, oggi, è l'incremento dell'aspergillosi anche nei soggetti affetti da BPCO in trattamento steroideo cronico.
Nel corso degli ultimi anni si è assistito ad un aumento di casi di aspergillosi polmonare associata ad influenza (*influenza-associated pulmonary aspergillosis*, IAPA) oppure a COVID-19 (*COVID-19-associated pulmonary aspergillosis*, CAPA), malattie caratterizzate da elevata prevalenza in alcune coorti, assenza di fattori dell'ospite classici per lo sviluppo dell'infezione fungina invasiva, rapida tempistica di sviluppo/riscontro (soprattutto per IAPA) dopo il ricovero in terapia intensiva e presenza di linfopenia. Diversi studi sono in corso per definire se la sindrome respiratoria acuta grave conseguente all'infezione da SARS-CoV-2 sia di per sé il principale fattore di rischio per lo sviluppo della CAPA o se fattori di rischio aggiuntivi, come per esempio la terapia con corticosteroidi, aumentino ulteriormente il rischio di progressione della malattia.

La diagnostica per immagini, mediante TC del torace ad alta risoluzione (HRCT), evidenzia quadri variabili: infiltrati o noduli più o meno disseminati con *halo sign* perifocale nell'80%

dei pazienti HSTC soffusione emorragico-infartuale intorno alla zona centrale di necrosi coagulativa) o con l'*air crescent sign.* Tali segni radiologici sono più frequenti nelle popolazioni a rischio classiche (per esempio, pazienti sottoposti a HSCT o con neoplasie ematologiche), che in pazienti con fattori di rischio non classici (per esempio, in caso di IAPA o CAPA).

L'importanza del ruolo sostenuto dal "terreno predisponente" è testimoniata dalla forma clinica nota con il nome di "aspergillosi semi-invasiva" che dal punto di vista epidemiologico si configura come malattia cronica di pazienti moderatamente immunodepressi (etilismo, diabete), affetti da preesistenti lesioni polmonari (collagenosi, sarcoidosi, BPCO). Clinicamente si apprezza un quadro di broncopolmonite febbrile che può eventualmente evolvere in infarto polmonare (dispnea, emottisi, pleurite) senza segni di ipossiemia.

Differente è il meccanismo di insorgenza dell'aspergilloma, tipica patologia dell'adulto, che necessita della preesistenza di una cavità polmonare in comunicazione con l'albero respiratorio (molte malattie possono produrre queste cavità come la tubercolosi, la sarcoidosi, le neoplasie, la fibrosi cistica, ecc). Da ultimo sono possibili manifestazioni allergiche come l'aspergillosi asmatica, l'aspergillosi alveolare infiltrativa, l'aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA), e l'alveolite allergica estrinseca.

Per quanto concerne la prognosi si segnala che: 1. l'evoluzione degli aspergillomi è imprevedibile, potendosi presentare con quadri asintomatici o con caratteristiche rapidamente e drammaticamente evolutive (emottisi massive in alcuni casi letali); 2. l'aspergillosi broncopolmonare allergica e l'alveolite allergica estrinseca da *Aspergillus* si caratterizzano per la lenta evoluzione alternando molteplici fasi di riacutizzazione e di remissione che comportano un danno polmonare esteso e, se non ben controllato, irreversibile; 3. l'evoluzione dell'aspergillosi invasiva è gravata da prognosi spesso infausta, con tassi di mortalità complessiva superiori al 50% nonostante la terapia antifungina.

Emergomyces spp., in precedenza noto come *Emmonsia* spp., è stato riconosciuto come micete dimorfo nei primi anni di questo secolo. Sono state descritte cinque specie: *E. pasteurianus* (segnalato in Italia, Spagna, Francia, Olanda, Cina, India, Uganda e Sud Africa), *E. africanus* (Sud Africa e Lesotho), *E. canadensis* (Canada e Stati Uniti), *E. orientalis* (Cina) ed *E. europaeus* (Germania). La maggior parte dei casi è stata segnalata in Sud Africa. L'infezione sembra colpire esclusivamente i pazienti immunocompromessi (persone affette da infezione da HIV, trapiantati d'organo solido, pazienti onco-ematologici od in terapia con farmaci immunosoppressivi), in cui causa infezioni disseminate. La prima sede di infezione è rappresentata dal polmone, con patologie reticolo-nodulari diffuse, consolidamento, effusioni e/o linfoadenopatia. La maggior parte dei pazienti affetti da *E. africanus* presentava anche lesioni cutanee (papule, placche, ulcere e noduli), mentre quelli affetti da tutte le altre specie presentavano infezione disseminata.

Pneumocystis jirovecii è responsabile della pneumocistosi polmonare. Essa si osserva soprattutto nei pazienti immunodepressi, con grave *deficit* dei T-linfociti, classicamente i soggetti affetti da AIDS. Tra i pazienti non affetti da infezione da HIV la pneumocistosi si osserva in soggetti con *deficit* immunologici misti, malattie ematologiche maligne, in soggetti trapiantati di midollo (58%), oppure affetti da malattie infiammatorie inclusa l'epatopatia alcolica eventualmente in terapia con steroidi (26%), da tumori solidi (17,5%) o

sottoposti a trapianto d'organo solido (8%). L'insorgenza è acuta. Il quadro clinico è quello di una pneumopatia interstiziale acuta con variabile *grading* di ipossiemia.

Significato assolutamente controverso nella patogenesi di pneumopatie infettive hanno le forme sostenute dai lieviti: se è assolutamente dimostrato il tropismo respiratorio di *Cryptococcus neoformans,* il ruolo di *Candida* spp è in genere escluso. Il coinvolgimento polmonare di *C. neoformans* è per lo più asintomatico (anche se è possibile rilevare con la diagnostica per immagini quadri di criptococcoma solitario polmonare, di 2-10 cm di diametro, in sede sottopleurica), ma può anche accompagnarsi a coinvolgimento linfatico ilare e pleurico ovvero ad estesi infiltrati peribronchiali escavati. La criptococcosi si riscontra nell'85% dei casi in soggetti affetti da AIDS (2-7 casi per 1000 infetti da HIV nelle casistiche pre-terapia antiretrovirale ART), ovvero nei pazienti affetti da malattie oncoematologiche maligne, da sarcoidosi e da diabete mellito dove l'incidenza è però molto minore, intorno a 0,4-1,3 casi per 100.000.

In generale, i virus che più frequentemente causano LRVI acuta, soprattutto nei pazienti immunodepressi, includono il virus dell'influenza A, il virus dell'influenza B, l'RSV, i rinovirus, gli adenovirus e i virus parainfluenzali. Tuttavia, da quando sono state introdotte su larga scala le nuove tecniche microbiologiche basate sull'identificazione molecolare, altri virus come i metapneumovirus e i coronavirus sono stati segnalati in aumento nella popolazione generale. Infine, virus come il citomegalovirus (CMV), l'herpes simplex virus (HSV) o il virus della varicella zoster (VZV) sono stati comunemente identificati.

I soggetti con *deficit* dell'immunità cellulo-mediata (soprattutto riceventi trapianto di cellule staminali emopoietiche od organi solidi) possono sviluppare con elevata frequenza infezione virali opportunistiche in grado di determinare sindromi d'organo severe. Le polmoniti sono tra le più frequenti localizzazioni d'organo nei pazienti trapiantati, mentre i virus responsabili di polmoniti opportuniste sono principalmente il Cytomegalovirus umano (hCMV), HHV-6, HSV 1-2 e VZV. Inoltre, nei pazienti con *deficit* T-cellulare anche infezioni da virus respiratori circolanti in comunità (quali influenza virus A e B, hMPV, RSV, HRV, EV e hAdV) possono acquisire caratteri di particolare gravità.
In particolare, hCMV può stabilire latenza in diverse sedi anatomiche avendo come *target* le cellule parenchimali di diversi organi (incluse le cellule epiteliali alveolari) oltre che cellule endoteliali, e può disseminare a diversi organi e tessuti tramite cellule circolanti (macrofagi, cellule dendritiche, leucociti). Le terapie immunosoppressive in ambito trapiantologico possono condurre a riattivazioni virali inizialmente asintomatiche che, in assenza di terapia mirata possono sfociare in sindromi d'organo.
Il danno al parenchima polmonare può comportare l'insorgenza di polmonite interstiziale con edema alveolare, essudato proteico e presenza di membrane ialine, riduzione degli scambi ed insufficienza respiratoria.
Le polmoniti da virus opportunisti sono gravate da elevata morbidità e mortalità, sia in conseguenza delle condizioni di immunocompromissione dell'ospite che della disponibilità di un limitato corredo antivirale specifico.

B6. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLA MALATTIA BRONCHIECTASICA

L'ampio ricorso alla TC del torace ad alta risoluzione (HRCT) in soggetti spesso anziani ed etichettati come in stadio iniziale di BPCO, contraddistinti da disturbi respiratori cronici come tosse produttiva quotidiana e frequenti infezioni polmonari, ha permesso di definire le brochiectasie come patologia respiratoria cronica: "la sindrome bronchiectasica", entità altrimenti misconosciuta. La riacutizzazione di bronchiectasie "prevista" nelle recenti definizione e classificazione delle LRTI raccomanda nelle forme purulente una periodica sorveglianza epidemiologica della possibile colonizzazione, la terapia antibiotica solo nei pazienti con riacutizzazione certa e l'individuazione del patogeno responsabile mediante riscontro culturale su espettorato. Un trattamento empirico iniziale dovrebbe essere instaurato solo dopo attenta analisi e stratificazione dei rischi di una infezione da *Pseudomonas* spp. con eventuale modificazione della terapia dopo riscontro microbiologico.

Le eziologie più frequentemente implicate nella malattia bronchiectasica sono, in età pediatrica, *H. influenzae, S. pneumoniae, S. aureus* e *M. catarrhalis. Pseudomonas aeruginosa* è di riscontro meno frequente nei giovani.

Nella popolazione adulta *P. aeruginosa* e *H. influenzae* sono i microrganismi più frequentemente isolati e responsabili di infezione cronica, anche se è sempre possibile riscontrare anche *S. pneumoniae, S. aureus e M. catarrhalis*. Tra i miceti, *Aspergillus* spp. e talvolta *Scedosporium* spp. possono essere isolati in un piccolo numero di pazienti mentre il riscontro di una colonizzazione cronica da *S. aureus* è spesso associata a quadri di ABPA o di fibrosi cistica.

I pazienti che presentino una riacutizzazione infettiva dovrebbero essere valutati attentamente al fine di stabilire l'opportunità di una loro gestione in ambito ospedaliero piuttosto che domiciliare. Questa decisione dipende da vari fattori legati al paziente (possibilità di realizzare schemi di terapia antibiotica parenterale al proprio domicilio), e all'esperienza del *team* medico ed infermieristico.

B7. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE DEL VIAGGIATORE

Il viaggiatore internazionale può infettarsi, nel corso del viaggio, con microrganismi endemici in aree geografiche diverse da quella italiana sviluppando patologie del tutto inconsuete che devono essere sospettate sulla base dei dati epidemiologico ed anamnestico. Tali patologie sono spesso caratterizzate da quadri semeiologici assolutamente definiti. I possibili agenti eziologici per il viaggiatore con sintomatologia respiratoria sono rappresentati, oltre che dai comuni patogeni (inclusi la *Legionella* ed il *Mycobacterium tuberculosis*), da batteri, miceti e virus endemici in particolari aree geografiche. Occorre anche considerare, sulla base dei dati epidemiologici ed anamnestici, la possibilità che un paziente con sintomatologia febbrile e tosse insistente presenti un quadro di malaria, di febbre tifoide oppure di dengue. In particolare, le patologie più probabili con un periodo di incubazione inferiore a 14 giorni sono costituite dalla legionellosi, dall'influenza e dalle micosi endemiche. Un paziente con sintomatologia febbrile e tosse insistente è più probabile che presenti una malaria, una febbre tifoide o la dengue, in accordo con il dato epidemiologico del

Paese di provenienza e le modalità di contagio. In tal senso dovrebbe essere indirizzato l'iter diagnostico.

Si segnalano i casi definiti delle infezioni da batteri, miceti dimorfi, e da virus assenti nelle nostre regioni.

La peste polmonare (infezione da *Yersinia pestis*) è la forma più contagiosa e più grave di peste. Descritta in forme aneddotiche nell'altopiano iraniano, nell'India occidentale, nel Madagascar e nelle regioni desertiche degli Stati Uniti d'America (New Mexico), si caratterizza per un'incubazione breve (da poche ore ad un paio di giorni) seguita dalle fasi di invasione (febbre elevatissima, cefalea, brividi, nausea e vomito) e di stato (sensazione di oppressione toracica, tachipnea superficiale, cianosi e tosse; espettorato 'a sciroppo di fragola'; immagini radiologiche non raramente di cavitazione).

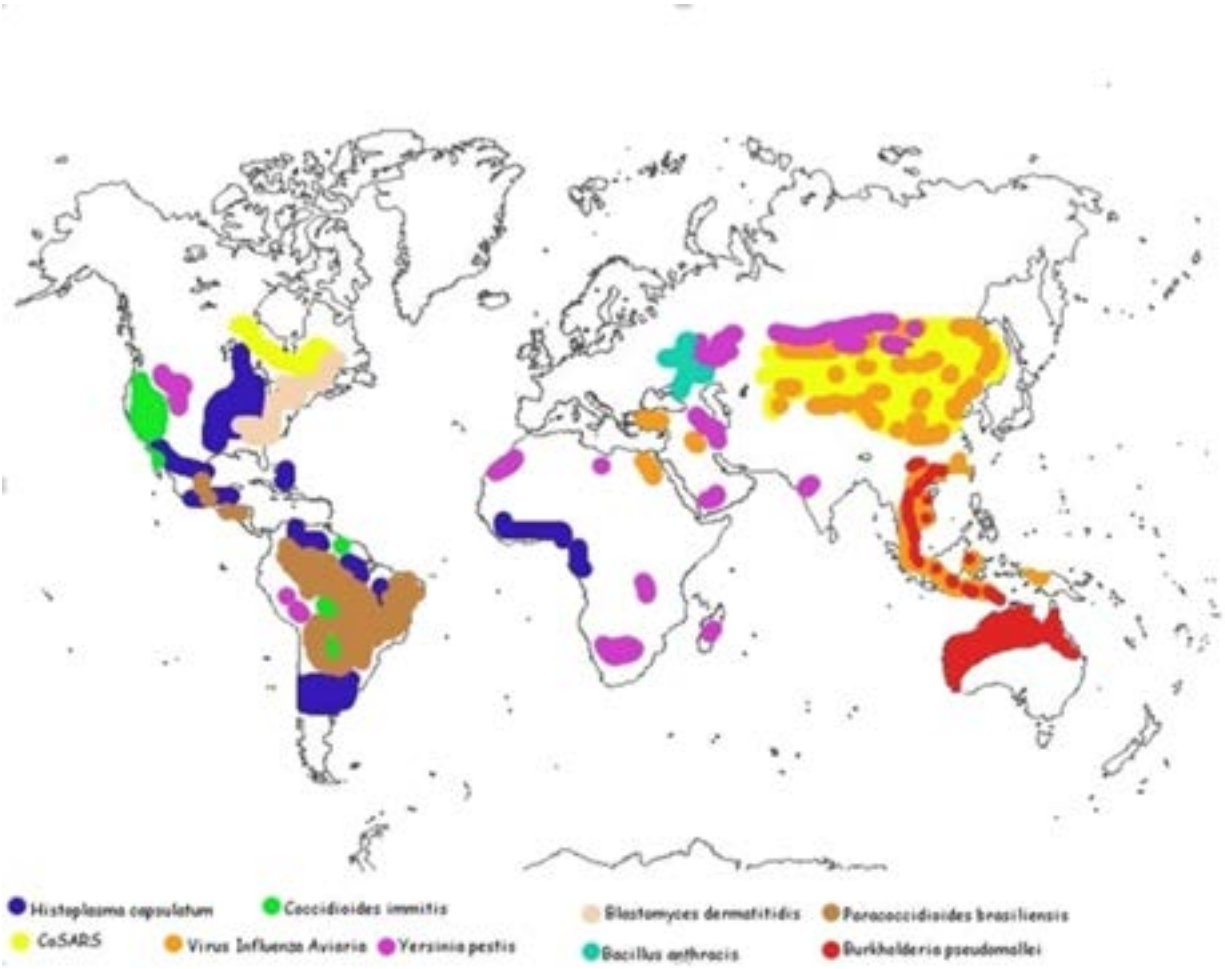
Il carbonchio (infezione da *Bacillus anthracis*) polmonare primitivo deve essere sospettato nel caso della positività anamnestica per un soggiorno nelle regioni mediorientali dell'altopiano iraniano e delle catene caucasiche. Si manifesta con un quadro di broncoalveolite diffusa con compromissione pleurica ed espettorazione emorragica. Dopo un esordio assolutamente anonimo dal punto di vista clinico, la sintomatologia si aggrava per la comparsa di dispnea stridula e cianosi, e di immagini radiologiche di impegno mediastinico. Il decorso può essere a rapida evoluzione, con una mortalità significativa in assenza di terapia antibiotica efficace.

La melioidosi (infezione da *Burkholderia pseudomallei*) è endemica nell'Asia sudorientale, in Australia nell'Africa centrale, occidentale e orientale, in India e in Cina. L'esordio della forma polmonare può essere improvviso o graduale, con cefalea, anoressia, dolore toracico o pleurico sordo e mialgia generalizzata. La febbre è di solito >39°C. Tosse, tachipnea e rantoli sono caratteristici; l'escreato può essere striato di sangue. Il radiogramma toracico evidenzia un consolidamento del lobo superiore, con cavitazioni frequenti o con lesioni nodulari e versamento pleurico.

Le forme batteriche sopra descritte devono essere prese in considerazione anche nell'ambito delle problematiche relative al bioterrorismo.

Per quanto attiene alle forme da miceti dimorfi, si segnala che i cambiamenti climatici in corso non consentono, oggi, di ritenere granitica la rigorosa classificazione dell'areale classico della loro distribuzione. Tuttavia le infezioni da *Histoplasma capsulatum* devono essere certamente sospettate in caso di soggiorno nelle zone endemiche degli Stati Uniti d'America (soprattutto la valle del Mississippi), dell'America caraibica e Centrale, e dell'Africa occidentale. Il quadro clinico si configura come una polmonite con infiltrati di tipo broncopneumonico a contorno irregolare e potenzialmente confluenti, bilaterali, multipli e diffusi, molto più raramente a lesioni uniche o paucifocali. Alternativamente, possono essere evidenziati infiltrati peribronchiali di provenienza ilare, od opacità rotondeggianti, isolate o raggruppate, miliariformi o nodulari, con interessamento dei linfonodi ilari. La sintomatologia consiste nella presenza di tosse, febbre modesta, astenia, anemia, calo ponderale, tachicardia sudorazioni profuse. Modesta è l'obiettività toracica a fronte dell'impegno

evidenziato con la diagnostica per immagini e accompagnato dalla significatività delle alterazioni degli indici infiammatori e della leucopenia.



Le infezioni da *Coccidioides immitis/posadasii* devono essere sospettate in caso di soggiorno nelle zone semidesertiche al confine tra gli USA ed il Messico (dal Texas occidentale alla California) o in altre zone altamente polverose dell'America Centrale e Latina. Il quadro evidenzia spesso un infiltrato pneumonico ilifugo dei lobi medio ed inferiore ovvero un nodulo solitario a margini netti che può evolvere con reazione fibrotica delimitante oppure cavitazione. Frequentemente concomitano manifestazioni cutanee. Significative sono le alterazioni degli indici infiammatori e la leucocitosi caratteristicamente eosinofila.

Le infezioni da *Blastomyces dermatitidis/gilchristii* devono essere sospettate in caso di soggiorno in aree boschive degli USA (lungo il corso dei fiumi Ohio, Missouri e Mississippi e nella zona dei Grandi Laghi) e nelle zone dell'Africa tropicale ed in Messico. Ai sintomi generali (febbre, brividi, sudorazioni notturne, calo ponderale ed astenia) si accompagnano tosse ed espettorazione mucopurulenta od emoftoica. La diagnostica per immagini mostra l'importante coinvolgimento dei linfonodi ilari e mediastinici. Significative sono le alterazioni degli indici infiammatori, la leucocitosi e l'anemia ipocromica.

Le infezioni da *Paracoccidioides brasiliensis/lutzii* devono essere sospettate in caso di soggiorno nelle Americhe Centrale e Meridionale. Evidente è la dissociazione tra i sintomi generali, assai poveri, e la gravità delle lesioni radiologiche: infiltrati polmonari multipli, spesso paramediastinici ed ilifughi, con coinvolgimento dei linfonodi ilari, oppure micronoduli "a nido d'ape" escavati. Significative sono le alterazioni degli indici infiammatori e la leucocitosi (neutrofila, ma anche eosinofila e monocitica).

Talaromyces (*Penicillium*) *marneffei* è un micete dimorfo in grado di causare malattia sia nei soggetti normoergici sia nei pazienti immunocompromessi. È stato descritto come un importante patogeno opportunista tra i pazienti affetti da infezione da HIV in Indocina: molti dei casi descritti provenivano dalla provincia di Chiang Mai nel nord della Thailandia. Altri fattori predisponenti sono costituiti dai disordini linfoproliferativi, dalle bronchiectasie e dalla tubercolosi, da patologie autoimmuni e dalla terapia steroidea. Tutti i casi italiani finora descritti si sono verificati in soggetti che avevano soggiornato nelle zone di diffusione di questo micete: Thailandia settentrionale, Vietnam, Hong Kong, Taiwan e Cina Meridionale.

Tra le forme virali, la SARS (causata dal *Severe Acute Respiratory Sindrome,* SARS-CoV) si è resa responsabile di un focolaio epidemico di più di 8.000 casi (con 800 decessi) tra il 2002 ed il 2003 nei Paesi del Sud Est asiatico, in Nord America e, in forma assolutamente sporadica, in Europa. Il quadro clinico, caratterizzato da faringodinia, rinorrea, brividi, mialgie, cefalea, diarrea e sintomi respiratori, si associa spesso a linfopenia, rialzo delle transaminasi, della creatinfosfochinasi, della lattatodeidrogenasi e della Proteina C Reattiva (PCR) e ad un allungamento del tempo di protrombina. Dal 2003 al 2012 non ci sono state altre segnalazioni sulla circolazione di questo virus nell'uomo, sebbene occasionali segnalazioni sulla presenza di virus simili negli animali (pipistrelli) siano comparse nella letteratura scientifica.

Nel settembre 2012 è stata segnalata la presenza nella Penisola Arabica di un ceppo di coronavirus con caratteristiche di aggressività clinica simile a quello della SARS (Sindrome respiratoria Medio-Orientale), pur essendo geneticamente distinto (*Middle East Respiratory Syndrome,* CoV, MERS-CoV). L'origine zoonotica di questo nuovo ceppo pare riconducibile ai pipistrelli ed ai dromedari (e l'infezione ha colpito ad oggi 2.608 soggetti con 938 decessi (con un *case-fatality rate* del 36%). La diagnosi di SARS o MERS-CoV deve essere sospettata ed ipotizzata solo in soggetti con polmonite radiologicamente documentata (infiltrati multipli) che riferiscano – nei dieci giorni precedenti l'insorgenza dei sintomi – un soggiorno in Cina, a Taiwan, ad Hong Kong o nella Penisola Arabica oppure contatti con soggetti di ritorno da quei paesi. Il sospetto viene avvalorato da una anamnesi che descriva contatti con animali durante il soggiorno all'estero. Assolutamente rilevante il criterio diagnostico epidemiologico. Nel maggio 2013, la Regione Toscana ha comunicato un caso confermato, di importazione, di infezione da MERS-CoV, a cui hanno fatto seguito due nuovi casi (una bambina di circa due anni, facente parte della famiglia del primo paziente, ed un collega di lavoro dello stesso). Il sospetto di infezione da MERS-CoV va considerato fino a 14 giorni dopo il rientro da un paese classificato come endemico.
Tuttavia, in assenza di *cluster* d'infezione anche limitati numericamente, ma accertati dal punto di vista diagnostico, l'ipotesi di infezione da SARS-CoV deve essere posta in modo molto critico e prudenziale.
Se oggi la SARS non rappresenta la prima ipotesi diagnostica, deve essere presa in considerazione per viaggiatori di provenienza dagli stessi territori l'influenza aviaria

dovuta a ceppi ad alta patogenicità quali H5N1, H7N7 o H9N2 sempre che riferiscano in anamnesi una possibile esposizione al contagio. Il WHO ed il Ministero della Salute hanno emanato raccomandazioni per il viaggiatore proveniente da aree endemiche con indicazioni anche per l'*iter* diagnostico: in particolare sono oggi di attualità l'endemia di virus dell'influenza aviaria A/H7N9 in alcune regioni della Cina.

I ceppi di Hantavirus del Nuovo Mondo (Nord, Centro e Sud America) sono associati ad una sindrome repiratoria specifica (Hantavirus *Pulmonary Syndrome*, HPS), mentre i ceppi Eurasiatici si manifestano con una sindrome emorragica con insufficienza renale acuta (Hantavirus *Hemorragic Fever with Renal Syndrome*, HFRS). L'infezione è trasmessa da roditori all'uomo tramite l'inalazione di polveri contaminate da deiezioni infette. La particolare distribuzione geografica, il dato anamnestico di contatto con roditori e/o loro deiezioni unitamente al dato epidemiologico costituito dalla presenza di focolai attivi dovrebbe poter orientare la diagnosi in soggetti di ritorno da zone endemiche. Si evidenzia che non è possibile porre diagnosi di laboratorio di infezione da Hantavirus nei pazienti che siano asintomatici o che almeno non siano stati asintomatici in passato (secondo la letteratura scientifica il periodo di incubazione va da 9 a 33 giorni dall'esposizione). A settembre 2012 è stata resa nota l'occorrenza di *cluster* di casi inattesi di infezione da Hantavirus presso il Parco Nazionale Yosemite, California, USA in campeggiatori che hanno soggiornato in alcuni *bungalows* del parco.

B8. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI COMUNITARIE NEL SOGGETTO ESPOSTO A CONTATTI CON ANIMALI

Il riconoscimento di condizioni epidemiologiche particolari, quale l'esposizione ad animali oppure a prodotti di derivazione zootecnica, può essere d'ausilio nel riconoscimento eziologico di forme polmonari altrimenti di difficile inquadramento nosologico.
È il caso delle localizzazioni polmonari da *Pasteurella multocida* che sono riscontrate in soggetti genericamente immunodepressi (etilismo, tabagismo, bronchiectasie, neoplasie polmonari) i quali riferiscano contatti abituali con animali, in particolare suini. Queste forme non presentano quadri clinici patognomonici: oltre a localizzazioni delle vie aree superiori, sono descritte pleuriti e polmoniti.

Entità nosologica ben configurata è la psittacosi (infezione da *Chlamydophila psittaci*), che si osserva in soggetti che, a contatto con volatili (pappagalli e parrocchetti, più raramente polli, piccioni, canarini e solo occasionalmente uccelli marini), inalano la polvere di penne o di guano. La psittacosi è una forma zoonotica che trova la sua origine anche in animali diversi dai volatili, come ovini, caprini e bovini: in questo caso si tratta spesso di un'esposizione di tipo professionale. Dopo un'incubazione di 1-3 settimane, il quadro clinico si configura per la presenza di ipertermia, malessere e tosse secca o produttiva, con segni di addensamento polmonare ad andamento ilifugo. Il trattamento antibiotico (tetraciclina o doxiciclina) deve essere continuato per almeno 14 giorni.

Tra i batteri responsabili di quadri polmonari in soggetti immunodepressi (in particolare se infettati da HIV) deve essere, infine, ricordato *Rhodococcus equi*, causa di quadri clinici eterogenei, dalle forme cavitarie a quelle lobari necrotizzanti: dato epidemiologico comune è il contatto con equini. Il trattamento antibiotico prevede l'utilizzo di glicopeptidi o di macrolidi, rendendosi a volte necessaria l'opzione chirurgica.

L'infezione da *Coxiella burnetii* consegue a contatti con animali infetti (ovini e caprini in particolare, ma anche cani e gatti) o con derivati, ovvero con zecche (principalmente ixodidi o del genere *Rhipicephalus*). Descritta in tutto il mondo, la febbre Q è sottostimata

a causa della sintomatologia aspecifica. Il periodo di incubazione è solitamente di 2-3 settimane. La diagnosi di laboratorio si basa sulla dimostrazione di anticorpi specifici nel siero del paziente nella fase di convalescenza. Se opportunamente trattata il tasso di mortalità inferiore è all'1%.

Assolutamente eccezionale è la localizzazione polmonare di *Leptospira interrogans*, responsabile delle forme influenzale e polmonare di leptospirosi. Essa deve essere sospettata in caso di negatività per altri patogeni in soggetti che, per motivi professionali o ricreazionali, vengano a contatto con deiezioni di piccoli roditori o di animali da reddito allevati in modo intensivo (suini e bovini) disperse nel suolo o nelle acque stagnanti.

L'influenza aviaria è causata da diversi virus dell'influenza di tipo A. Alcuni sottotipi (H5N1, H7N7 e H9N2) sono dotati di particolare patogenicità nell'animale (HPAI, *high pathogenicity avian influenzavirus*) e si differenziano da altri ceppi circolanti e basso potenziale patogenetico negli uccelli (LPAI, *low pathogenicity avian influenzavirus*). Particolarmente diffuso ed aggressivo è il ceppo H5N1 identificato nel 1997 ad Hong Kong e diffuso – a livello avicolo - in tutto il mondo e soprattutto nei Paesi del Sud-Est asiatico, dove la vendita di pollame vivo ai mercati costituisce la principale modalità di trasmissione. Il virus H5N1 (come altri sottotipi aviari) infetta svariati milioni di uccelli selvatici su scala mondiale, e si diffonde seguendo le principali rotte migratorie, senza per questo costituire un efficace patogeno umano: i casi di trasmissione umana sono quindi eventi assolutamente sporadici, che si generano in situazioni di stretto contatto ambientale fra uccelli ed esseri umani (allevamenti famigliari in zone a basso *standard* economico ed igienico). Dopo un periodo di incubazione da 2 a 7 giorni, la sintomatologia può variare da un quadro similinfluenzale a forme più gravi, caratterizzate da infezioni diffuse, quadri polmonari particolarmente gravi associati ad un altissimo livello di letalità (50%). Queste stesse caratteristiche cliniche sono riscontrate nell'infezione da ceppi H7N9 in Cina.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Al-Tawfiq JA, Kim H, Memish ZA. Parasitic lung diseases. *Eur Respir Rev* 2022; 31: 220093
- Álvarez-Lerma F, Marín-Corral J, Vilà C et al. Characteristics of patients with hospital-acquired influenza (A1H1)pdm09 virus admitted to the intensive care unit. *J Hosp Infect* 2017; 95: 200-206.
- American Geriatrics Society, AGS Beers Criteria® for potentially inappropriate medication use in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2023;71: 2052-2081.
- Ancidoni A, Bacigalupo I, Bellomo G et al. Survey nazionale sul contagio COVID-19 nelle strutture residenziali e sociosanitarie. Istituto Superiore di Sanità. Epidemia COVID-19, Aggiornamento nazionale: 05 maggio 2020. https://www.epicentro.iss.it/
- Angrill J, Agustì C, De Celis R et al. Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1628-1632.
- Apostopoulou A, Esquer Garrigos Z, Vijayavagiya P et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with SARS-CoV-2 infection: a systematic review of the literature. *Diagnostics (Basel)* 2020; 10: 807.
- Assiri A, McGeer A, Perl TM, et al. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome cornavirus. *N Engl J Med* 2013; 369: 407-416.
- Baral SD, Rucinski KB, Twahirwa Rwema JO et al. The relationship between the global burden of influenza from 2017 to 2019 and COVID-19: descriptive epidemiological assessment. *JMIR Public Health Surveill* 2021; 7: e24696.
- Bianchini S, Silvestri E, Argentiero A et al Role of Respiratory Syncitial Virus in pediatric pneumonia. *Microorganisms* 2020; 8: 2048.
- Boeddha NP, Schlapbach LJ, Driessen GJ et al. Mortality and morbidity in community-acquired sepsis in European pediatric intensive care units: a prospective cohort study from the European Childhood Life-threatening Infectious Disease Study (EUCLIDS). *Crit Care* 2018;2 2: 143.

- BTS Care Bundles for CAP and COPD. 2014. https://www.brit-thoracic.org.uk/audit-and-quality-improvement/bts-care-bundles-for-cap-and-copd/
- Burk M, El-Kersh K, Saad M et al. Viral infection in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Rev* 2016; 25:1 78-188.
- Charles PG, Wolfe R, Whitby M et al. SMART-COP: a tool for predicting the need for intensive respiratory or vasopressor support in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 375–384.
- Chen L, H X-D, Li Y-L et al. Severity and outcomes of influenza-related pneumonia in type A and B strains in China, 2013-2019. *Infect Dis Poverty* 2020; 9: 42.
- Chen L, Zhang J, Pan G et al. Cuffed versus uncuffed endotracheal tubes in pediatrics: a meta-analysis. *Open Med (Wars)* 2018; 13: 366-373.
- Choi SH, Huh JW, Hong SB et al. Clinical characteristics and outcomes of severe rhinovirus-associated pneumonia identified by bronchoscopic bronchoalveolar lavage in adults: comparison with severe influenza virus-associated pneumonia. *J Clin Virol* 2015; 62: 41-47.
- Coste A, Frérou A, Raute A et al. The extent of aspergillosis in critically ill patients with severe influenza pneumonia: a multicenter cohort study. *Crit Care Med* 2021;4 9: 934-942.
- Cottin V, Capron F, Grenier P et al. Pneumopathies interstitielles diffuses idiopathiques. *Rev Mal Respir* 2004; 21: 299-318.
- Chow EJ, Mermel LA. Hospital-acquired respiratory viral infections: incidence, morbidity, and mortality in pediatric and adult patients. *Open Forum Infect Dis* 2017; 4 (01) ofx006.
- de Girolamo G, Bellelli G, Bianchetti A et al. Older people living in long-term care facilities and mortality rates during the COVID-19 pandemic in Italy: preliminary epidemiological data and lessons to learn. Front. *Psychiatry* 2020; 11: 586524.
- Di Pasquale MF, Sotgiu G, Gramegna A. et al; GLIMP Investigators. Prevalence and etiology of community-acquired pneumonia in Immunocompromised Patients. *Clin Infect Dis* 2019; 68 (09) 1482-1493
- Drexler JF, Gloza-Rausch F, Glende J et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J Virol* 2010; 84: 11336-11349
- Falsey AR, Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 518-524.
- Feys S, Gonçalves SM, Khan M et al. Lung epithelial and myeloid innate immunity in influenza-associated or COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: an observational study. *Lancet Respir Med* 2022; 10: 1147-1159.
- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016.ì: a systematic analysis for the global burden of the disease study 2016. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 1191-1210.
- GBD 2017 Influenza Collaborators. Mortality, morbidity, and hospitalisations due to influenza lower respiratory tract infections, 2017: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Respir Med* 2019; 7: 69-89
- GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2020; 396 (10258): 1204-1222
- Goglio A, Amer M, Callegaro A et al. Infezioni delle basse vie respiratorie da batteri e miceti: consensus sull'iter diagnostico microbiologico. *Giorn It Infez Osp* 1998; 5: 91-109.
- Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.13th ed. Washington DC: *Public Health Foundation*; 2015
- Harris M, Clark J, Coote N et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 2011; 66 (Suppl 2): ii1-ii23.
- https://www.cdc.gov/fungal/climate.html
- https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html
- Iosifidis E, Pitsava G, Roilides E. Ventilator-associated pneumonia in neonates and children: a systematic analysis of diagnostic methods and prevention. *Future Microbiol* 2018; 13: 1431-1446.
- Iuliano A, Aranda Z, Coulburn T et al. The burden and risk of pediatric pneumonia in Nigeria: a desk-based review of existing literature and a data. *Pediatr Pulmonol* 2020: 55 Suppl 1: S10-S21.
- Iuliano A, Roguski KM, Chang HH. et al; Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet* 2018; 391 (10127): 1285-1300.
- Klein EY, Monteforte B, Gupta A et al. The frequency of influenza and bacterial coinfection: a systematic review and meta.analysis. *Influenza Other Respir Viruses* 2016; 10: 394-403.
- Kunst H, Mack D, Kon, OM et al. Parasitic infections of the lung: a guide for the respiratory physician. *Thorax* 2011; 66:528-536.

- Jain S, Self WH, Wunderink RG et al. Community-acquired pneumonia requirinìg hospitalizatioon among U.S. adults. *N Engl J Med* 2015; 373:415-427.
- Jain S, Williams DJ, Arnold SR et al. Community-acquired pneumonia requirinìg hospitalizatioon among U.S. chilgren. *N Engl J Med* 2015; 372:835-845.
- Janssens JP, Krause KH. Pneumonia in the very old. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 112-124.
- Lee JY, Yang PC, Chang C et al. Community-acquired adenoviral and pneumococcal pneumonia complicated by pulmonary aspergillosis in an immunocompetent adult. *J Microbiol Immunol Infect* 2019; 52: 838-839.
- Lim YK, Kweon OJ, Kim HR et al. Impact of bacterial and viral coinfection in community-acquired pneumonia in adults. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019; 94: 50-54.
- Lim WS, Baudouin SV, George RC et al. Pneumonia Guidelines Committee of the BTS Standards of Care Committee. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax* 2009;6 4(Suppl 3): iii1–55.
- Liao CC, Tsai MH, Lai SH et al. Safety and clinical application of nonbronchosopic bronchoalveolar lavage in preterm neonates with clinical ventilator-associated pneumonia. *Pediatr Neonatol* 2021; 62: 195-201.
- Martin-Loeches I, Torres A, Nagavci B et al. ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of severe community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2023 61(4):2200735.
- Mehta AC et al. (eds.), Diseases of the Central Airways, *Respiratory Medicine*, 2016
- Metlay JP, Waterer GW, Long AC, et al. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia: an official clinical practice guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(7):e45–e67.
- Moghnieh R, Yared Sakr N, Kanj SS et al. The Lebanese Society for Infectious Disease and Clinical Microbiology (LSIDCM) guidelines for adult community-acquired pneumonia (Cap) in Lebanon. *J Med Liban* 2014; 62:40-47.
- Mohamed A, Rogers TR, Talento AF. COVID-19 associated invasive pulmonary aspergillosis: diagnostic and therapeutic challenges. *J Fungi (Basel)* 2020; 6: 115.
- Moyo P, Zullo AR, McConeghy KW et al. Risk factors for pneumonia and influenza hospitalizations in long-term care facility residents: a retrospective cohort study. *BMC Geriatr* 2020: 20, 47.
- NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Pneumonia (including community acquired pneumonia). 2014. http://www.nice.org.uk/guidance/cg191.
- Piralla A, Rovida F, Girello A et al. Frequency of respiratory virus infections and next-generation analysis of influenza A/H1N1pdm09 dynamics in the lower respiratory tract of patients admitted tonthe ICU. *PLoS One* 2017;12(6): e0178926.
- Piralla A, Mariani B, Rovida F et al. Frequency of respiratory viruses among patients admitted to 26 Intensive Care Units in seven consecutive winter-spring seasons (2009-2016) in Northern Italy. *J Clin Virol* 2017; 92: 48-51.
- Pneumonia Etiology Research for Child Health (PERCH) Study Group. Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-county case-control study. *Lancet* 2019; 394: 757-779-
- Pronier C, Gacouin A, Lagathu G et al. Respiratory influenza viral load as a marker of poor prognosis in patients with severe symptoms. *J Clin Virol* 2021;136: 104761.
- Rello J, Esandi M-E, Diaz E et al. The role of Candida sp isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest* 1998; 114: 146-69.
- Shorr AF, Fisher K, Micek ST, Kollef MH. The burden of viruses in pneumonia associated with acute respiratory failure: an underappreciated issue. *Chest* 2018; 154 (01) 84-90
- Short KR, Kroeze EJBV, Fouchier RAM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect Dis* 2014; 14 (01) 57-69
- Schawvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med* 2018; 6: 782-792.
- Torres A, Niederman MS, Chastre J et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired (HAP)/ ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *Eur Respir J* 2017; 50: 1700582.
- Van Asten L, Pinzon AL, van de Kassteele J et al. The association between influenza infections in primary care and intensive care admissions for severe acute respiratory infection (SARI): a modelling approach. *Influenza Other Respir Viruses* 2020; 14: 575-586.

- van Someren Gréve F, Juffermans NP, Bos LDJ. et al. Respiratory viruses in invasively ventilated critically ill patients—a prospective multicenter observational study. *Crit Care Med* 2018; 46: 29-36.
- Verweij PE, Rijnders BJA, Brüggemann RJM, et al. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. *Intensive Care Med* 2020; 46:1524-1535.
- World Health Organization. Research needs for the Battle against Respiratory Viruses (BRaVe). Published online 2013. Available at https://www.who.int/influenza/patient_care/clinical/BRaVe_Research_Agenda_2013.pdf?ua=1
- World Health Organization. Universal Health Coverage Global Monitoring Report. 2019
- https://www.sciencemediacentre.org/expert-reaction-to-promed-report-on-undiagnosed-pneumonia-in-children-in-china/
- Zar HJ, Moore DP, Andronikou S et al. Diagnosis and management of community-acquired pneumonia in children: South African Thoracic Society guidelines. *Thorac Crit Care Med* 2020; 26 (3): 10.7196/AjTccM.2020.v26i3.104.
- Zhang H, Han Y, Jin Z et al. Detection of virises by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of patients with nonresponding Community-Acquired pneumonia. *Can Respir J* 2020; 2020: 8715756.
- Zhang N, Wang L, Deng X et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. J Med Virol 2020; 92: 408-417. *Can Respir J* 2020; 2020: 8715756.d
- Zhou F, Wang Y, Liu Y et al. Disease severity and clinical outcomes of community-acquired pneumonia caused by non-influenza respiratory viruses in adults: a multicentre prospective registry study from the CAP-China network. *Eur Respir J* 2019; 54: 1802406.

C. LE POLMONITI NOSOCOMIALI

Secondo i dati riportati nell'ultimo rapporto di indagine di prevalenza europea sulle infezioni correlate all'assistenza (ICA), le polmoniti acquisite in ambito nosocomiale (HAP e VAP) rappresentano il 21% di tutte le ICA e sono le prime infezioni in ordine di prevalenza. Nell'ambito della sorveglianza sono stati riportati 4.200 casi di polmonite ed i germi più frequentemente isolati da campioni respiratori associati erano, in ordine decrescente di frequenza: *P. aeruginosa* (15.1% sul totale degli isolati), *K. pneumoniae* (14.3%) e *S. aureus* (12.4%). Per tutte e tre queste specie il *report* evidenziava tassi di antibiotico-resistenza critici.

Il più recente *report* di *European Centre for Disease Prevention and Control*, relativo alle ICA contratte nei reparti di terapia intensiva in Europa nell'anno 2017, conferma che la polmonite è l'infezione più frequente in questo *setting.* In particolare, il 6% dei pazienti ammessi a un reparto di terapia intensiva per più di due giorni presentava un quadro di polmonite. Anche in questo *report*, *P. aeruginosa* era il germe più frequentemente causa di polmonite contratta nei reparti di terapia intensiva, seguito da *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Tra i problemi più rilevanti evidenziati dal *report* emerge la prevalenza di ceppi resistenti a meticillina in *S. aureus* (24% del totale) e quella dei ceppi di *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi (rispettivamente 24% e 15% del totale degli isolati della specie).

I dati italiani prodotti da GiViTI (Gruppo Italiano per la Valutazione degli Interventi In Terapia Intensiva), tramite il Rapporto Progetto PROSAFE dell'anno 2022, relativi a 117 Terapie Intensive polivalenti, ha riportato un numero di 1.560 casi di VAP in pazienti adulti "non - COVID-19" con un'incidenza stimata di VAP pari a 13,4 pazienti con VAP/n° giornate di ventilazione meccanica pre-VAP × 1.000. Questo dato conferma che la polmonite, specialmente la VAP, è la complicanza infettiva più frequente che si verifica durante il ricovero in ospedale, soprattutto nei reparti di Terapia Intensiva.
In diversi studi *case-matching*, la mortalità correlata alla polmonite nosocomiale o "mortalità attribuibile" è stata stimata tra il 33 e il 50%. Un ulteriore aumento dei tassi di

mortalità è stato associato alla presenza di batteriemia, soprattutto per le specie *P. aeruginosa* o *Acinetobacter* spp., alla presenza di sottostanti patologie mediche piuttosto che chirurgiche e al trattamento con terapia antibiotica inefficace.
Alla luce di quest'ultimo dato, è essenziale sottolineare che una tempestiva diagnosi eziologica riduce drasticamente il tasso di terapie antibiotiche inefficaci con ricadute positive in termini di miglior *outcome* per il paziente, ridotto consumo di antibiotici con conseguente effetto positivo sulla epidemiologia delle antibiotico-resistenze. In questo senso, la gestione diagnostica della polmonite nosocomiale risponde perfettamente ai principi della *diagnostic stewardship* e funge da valido supporto per la *antibiotic stewardship*.

Nel 2016 sono state pubblicate le linee guida di IDSA e ATS. Queste linee guida differiscono dalle precedenti raccomandazioni pubblicate nel 2005 introducendo l'uso della metodologia GRADE (*Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation*) per la valutazione di tutte le evidenze disponibili, nell'eliminazione del concetto di HCAP, nell'utilizzo di antibiogrammi per guidare i trattamenti antibiotici e nella somministrazione di terapie di breve durata per la maggior parte dei pazienti affetti da HAP o VAP, indipendentemente dalla loro eziologia microbica, nonché nel supporto alla *de-escalation therapy.* Analogamente, nel 2017, le linee guida di *European Respiratory Society* (ERS), *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) ed *Asociación Latinoamericana del Tórax* (ALAT) hanno fornito elementi importanti nell'inquadramento e nella gestione delle HAP e VAP. La maggior parte delle raccomandazioni riportate in questo percorso diagnostico sono tratte da queste due fonti.

C1. L'EPIDEMIOLOGIA MICROBICA DELLE POLMONITI NOSOCOMIALI

Sebbene i batteri normalmente colonizzino l'orofaringe, il tratto respiratorio inferiore rimane abitualmente sterile nella maggior parte delle persone sane non fumatrici. La ventilazione assistita costituisce il principale, ma non unico, fattore predisponente la VAP. A questo si aggiungono la sedazione, la curarizzazione, il coma, i traumi, la presenza di nutrizione enterale e di un pregresso intervento chirurgico. Episodi di polmonite nosocomiale si osservano nel 9-27% dei pazienti intubati, con una frequenza quattro volte superiore rispetto a quella registrata in soggetti non intubati. L'intubazione, come la re-intubazione, aumenta il rischio di polmonite da sei a ventuno volte. Questa pratica aumenta in maniera esponenziale il rischio di VAP tanto che dovrebbe essere, per quanto possibile, evitata. Ciò è dovuto all'abolizione della barriera costituita dalla glottide, alla più o meno grave compromissione del riflesso della tosse e della funzione mucociliare, al mancato filtro nasale e delle prime vie aeree, all'irritazione meccanica della mucosa, alla importante variazione dell'ecosistema microbico del tubo digerente, cavo oro-nasofaringeo incluso.
Per quanto attiene alla definizione degli agenti eziologici delle polmoniti nosocomiali, è documentata una variabilità dei patogeni preponderanti in rapporto al *timing* di insorgenza in rapporto al momento del ricovero e, per le forme associate a ventilazione invasiva, al momento dell'intubazione.
Facendo riferimento al modello delle VAP, che rappresentano le forme più gravi di polmonite nosocomiale, si distinguono tradizionalmente, dal punto di vista della diversa prevalenza di agenti eziologici, forme ad esordio molto precoce (*very early-onset*), precoce (*early*) e tardive (*late-onset*).

Le forme ad esordio precoce e molto precoce, la cui comparsa si osserva entro 2-4 giorni dall'intubazione, riconoscono come patogenesi prevalente un meccanismo di aspirazione e di trasposizione nel polmone della popolazione microbica colonizzante ad opera della protesi respiratoria (tubo endotracheale o cannula tracheostomica). Pertanto, gli agenti eziologici prevalenti sono per lo più microrganismi che hanno colonizzato le vie aeree superiori, determinando la rimodulazione del microbioma polmonare. Nei soggetti non precedentemente sottoposti a cicli di antibioticoterapia, essi sono solitamente più sensibili agli antibiotici, essendo normalmente poco esposti a pressione antibiotica. Nelle forme precoci di polmoniti nosocomiali, microrganismi tipicamente "domiciliari" quali *S. aureus* meticillino-sensibile, *S. pneumoniae* ed *H. influenzae* costituiscono circa il 55% degli agenti eziologici.

Al contrario, le forme ad insorgenza tardiva sono sottese ancora ad un meccanismo prevalente di aspirazione, ma di microrganismi colonizzanti sia l'ipofaringe, sia l'intestino (gastro-*pulmonary theory*). Quest'ultima appare particolarmente rilevante nelle forme *late onset*, in quanto la condizione di persistente alcalinizzazione del pH gastrico indotto dalla profilassi farmacologica dell'ulcera da *stress*, favorisce la risalita in faringe e da qui nell'albero respiratorio dei batteri colonizzanti il tratto gastroenterico. Alla luce di tale considerazione è evidente come il *pattern* di agenti eziologici sia estremamente più ampio ed in più sia rappresentato da specie residenti in ambito nosocomiale e dotate, quindi, di profili di resistenza complessi.

Pseudomonas aeruginosa, *K. pneumoniae*, *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) sono i microrganismi maggiormente associati a HAP e VAP tardive, seguiti da altre Enterobacterales e da altri Gram-negativi non fermentanti quali *A. baumannii*, *B. cepacia* e *S. maltophilia*. Gli episodi di polmonite sostenuti da microrganismi multiresistenti agli antibiotici (MDR) – tra i quali gli enterobatteri (*in primis K. pneumoniae*) carbapenemasi-produttori – sono sempre più frequenti nelle Organizzazioni Sanitarie per lungodegenti e per acuti, anche se la presenza dei germi multiresistenti varia significativamente con le caratteristiche epidemiologiche locali.

La suddivisione in *early* VAP e *late-onset* VAP è tuttavia stata recentemente messa in discussione; infatti, alcuni ricercatori hanno riscontrato eziologie comparabili in pazienti con VAP ad esordio precoce o tardivo. Ciò potrebbe essere correlato all'aumento mondiale dei patogeni MDR e sottolinea che l'ecologia locale delle unità di terapia intensiva è il fattore di rischio più importante per l'acquisizione di patogeni MDR, indipendentemente dalla durata dell'intubazione. Anche la gravità iniziale dell'HAP o della VAP (ad esempio lo *shock* settico) è un forte fattore di rischio per i patogeni MDR, indipendentemente dal momento dell'esordio.

La mortalità e il numero di *disability-adjusted life-years* (cioè la somma degli anni di vita persi per mortalità prematura e degli anni di vita vissuti in condizioni di salute non ottimale o di disabilità) associati a infezioni sostenute da MDR sono nettamente più alti rispetto a quelli associati a polmoniti nosocomiali sostenute da germi sensibili.

Assolutamente da non trascurare è altresì il rischio di polmonite nosocomiale correlata a colonizzazione esogena, ad opera di patogeni ambientali, prevalentemente contaminanti i sistemi idrici, che vengono inalati dopo aerosolizzazione delle acque. *Legionella* spp. rappresenta l'archetipo di tale categoria di patogeni, ma altri (quali *P. aeruginosa*, *S. maltophilia, Aspergillus* spp. e micobatteri a rapida crescita) hanno ruoli non secondari. La modalità di trasmissione in tali casi è legata a manovre di aspirazione, all'uso di broncoscopi, alla contaminazione di nebulizzatori, umidificatori e circuiti di ventilazione.

Studi recenti hanno dimostrato, d'altra parte, che l'impianto idrico delle strutture sanitarie può essere colonizzato da *Legionella* spp. dal 12% all'80%, con il conseguente rischio di casi sporadici o di focolai di legionellosi fino a rappresentare il 30% delle polmoniti nosocomiali.

Alcuni autori sostengono l'utilità delle colture di sorveglianza (colture dell'aspirato tracheale eseguite a cadenza fissa, fino a due volte alla settimana) per l'accertamento della colonizzazione tracheale da patogeni MDR, riscontrabile prima dello sviluppo di una VAP nel 94% dei casi. La colonizzazione del tubo endotracheale, con la creazione di un *biofilm* abitato da microrganismi, costituisce un rilevante fattore patogenetico, causa di successiva dispersione microbica nei distretti respiratori distali. Tali riscontri – se i dati di epidemiologia microbica locale non fossero già noti - possono essere utili per l'impostazione di una terapia empirica attiva in caso di sviluppo di VAP (tenendo conto dei profili di suscettibilità dei patogeni colonizzanti), ma non devono essere associati a *overtreatment* (terapia della colonizzazione in assenza di infezione).

Anche in assenza di tubo endotracheale l'inspirazione delle secrezioni orali e faringee mantiene un ruolo rilevante nella patogenesi delle polmoniti nosocomiali. L'inspirazione è un fenomeno fisiologico (45% nel sonno), ed è particolarmente significativa nei soggetti in trattamento con β-2-stimolanti, con sottostanti patologie neurologiche, a motivo delle disfunzioni della glottide, del permanere di secrezioni, e delle frequenti manovre di suzione effettuate con l'ausilio di dispositivi. Ciò comporta un importante ruolo dei batteri anaerobi residenti nel cavo orale: in questo caso gli episodi infettivi sono più frequenti nei primi cinque giorni di ricovero. Al contrario, l'inalazione o la diretta inoculazione di microrganismi nelle vie respiratorie, al pari della metastatizzazione polmonare conseguente alla disseminazione ematogena in soggetti portatori di cateteri vascolari, costituiscono un inconsueto meccanismo patogenetico.
Per quanto attiene al ruolo rivestito dai lieviti, l'inquadramento nosografico della pneumopatia da *Candida* spp. rimanda a descrizioni assolutamente aneddotiche: i casi istologicamente documentati che sono stati osservati riguardano quasi esclusivamente localizzazioni polmonari nell'ambito di forme poliviscerali o disseminate, appannaggio pressoché esclusivo dei pazienti immunocompromessi. Diverso è il caso della mucosite tracheobronchiale da *C. albicans*. Significato pressoché nullo – se non quello di espressione di colonizzazione - ha quindi usualmente il riscontro di *Candida* spp. nei campioni respiratori. Si segnala che questo genere fungino è un marcatore indicativo del fatto che – rispetto al soggetto non colonizzato - il paziente ha una possibilità 1,58 volte superiore di sviluppare una VAP e di 2,22 volte superiore di avere un'eziologia sostenuta da *P. aeruginosa*.

I virus respiratori sono anche patogeni comuni della polmonite acquisita in ospedale (HAP), con una percentuale compresa tra il 15% e il 30% negli adulti e circa il 50-60% nei bambini. Nell'ambito delle infezioni respiratorie nosocomiali vanno oggi annoverate anche le polmoniti virali, causate da virus influenzale di tipo A e B *in primis*. Trattazione a parte andrebbe riservata al COVID-19 nosocomiale. Pur non entrando nel dettaglio è utile segnalare che l'eziologia da SARS-CoV-2 deve sempre essere tenuta in considerazione tra le possibili cause di polmonite nosocomiale.

Per quanto riguarda i pazienti con HAP, i virus respiratori sono responsabili del 10-28% dei casi, con un'incidenza stimata di cinque casi di HAP ogni 10.000 ricoveri-anno. Nello studio retrospettivo caso-controllo di Micek *et al*. che includeva 174 casi di HAP non ventilati (NV) e 696 controlli hanno riportato un tasso di prevalenza del 24% di virus

respiratori nella NV-HAP. Analogamente, in un'analisi secondaria di uno studio di coorte prospettico hanno rilevato virus respiratori nel 22% dei pazienti con NV-HAP. In ordine di frequenza, i virus più comuni sono stati i rinovirus, l'influenza e virus parainfluenzali, i coronavirus, il metapneumovirus e l'RSV. Nello studio di Shorr *et al*. le infezioni virali erano risultate significativamente associate a un punteggio APACHE (*Acute Physiology and Health Evaluation* II) >26 e al trapianto di cellule staminali nei pazienti con polmonite sottoposti a ventilazione meccanica. La mortalità intraospedaliera dovuta a polmonite virale è stata elevata (37%) ma simile a quella di altre cause di polmonite (36%). In sintesi, sebbene un'ampia gamma di virus respiratori possa causare una grave LTRI, un'ampia percentuale di casi è attribuibile solo ad alcuni virus, ovvero virus influenzali, RSV e metapneumovirus. I virus respiratori causano circa un terzo degli episodi di CAP grave e sono presenti in un quarto dei casi di HAP. L'eziologia virale può variare in base all'età, alla stagionalità, all'ambiente geografico e allo stato immunitario.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Adair CG, Gorman SP, Feron BM et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intens Care Med* 1999; 25: 1072-1076.
- Alagna L, Mancabelli L, Magni F et al. Changes in upper airways microbiota in ventilator-associated pneumonia. *Intens Care Med Esperiment* 2023; 11: 17.
- American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Feb 15;171(4):388-416. doi: 10.1164/rccm.200405-644ST.
- Aya B, Rello J. Aetiopatogenesis of VAP revisited. *Eur Respir Mon* 2011; 53: 1-10.
- Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, *et al.* Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect Dis.* 2016 May 15;62(10): e51-77. doi: 10.1093/cid/ciw118. Epub 2016 Apr 13.
- Barton TD, Blumberg EA. Viral pneumonias other than cytomegalovirus in transplant recipients. *Clin Chest Med* 2005; 26: 707-720
- Beardsley JR, Williamson JC, Johnson JW *et al*. Using local microbiologic data to develop institution-specific guidelines of hospital-acquired pneumonia. *Chest* 2006; 130: 787-93.
- Bonten MJ, Bergmans DC, Stobberingh EE et al. Implementation of bronchoscopic techniques in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia to reduce antibiotic use. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1820-4
- Bouadma L, Deslandes E, Lolom I et al. Long-term impact of a multifaced prevention program on Ventilator-Associated Pneumonia in a medical Intensive Care Unit. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1115-1122.
- Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019 Jan;19(1):56-66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
- Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 65: 867-903
- Depuydt P, Benoit D, Vogelaers D et al. Systematic surveillance cultures as a tool to predict involvement of multidrug antibiotic resistant bacteria in ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2008; 34:675–82.
- El Solh AA, Akinnusi ME, Wiener-Kronish JP et al. Persistent Infection with Pseudomonas aeruginosa in Ventilator Associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 May 8.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare- associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals, 2016-2017. *Stockholm:* ECDC; 2023.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections in intensive care units - Annual Epidemiological Report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
- Ferrer M, Liapikou A, Valencia M et al. Validation of the American Thoracic Society–Infectious Diseases Society of America guidelines for hospital-acquired pneumonia in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 945–952.
- Gales AC, Jones RN, Forward KR et al. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999). *Clin Infect Dis* 2001; 32: S104-S113.

- Gillet Y, Tristan A, Rasigade JP et al. Prognostic factors of severe community-acquired staphylococcal pneumonia in France. *Eur Respir J* 2021; 58: 2004445.
- GiViTI Gruppo Italiano per la Valutazione degli Interventi In Terapia Intensiva Rapporto Progetto PROSAFE Anno 2022 Rapporto nazionale TI polivalenti (117 TI) ITALIA
- Hayon J, Figliolini C, Combes A, et al. Role of serial routine microbiologic culture results in the initial management of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165: 41-46.
- Hei H, Bezpalko O, Smathers SA et al. Development of a novel prevention bundle for pediatric healthcare-associated viral infections. I*nfect Control Hosp Epidemiol* 2018; 39: 1086-1092.
- Hilker R, Poetter C, Findeisen N et al. Nosocomial pneumonia after acute stroke. Implication for neurological intensive care medecine. *Stroke* 2003; 34: 975-981.
- https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/healthcare-associated-pneumonia-H.pdf
- https://www.cdc.gov/legionella/wmp/healthcare-facilities/healthcare-wmp-faq.html;
- https://legionellacontrol.com/guidance/why-is-legionella-a-bigger-risk-in-hospitals-care-homes/;
- Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 2016
- Klompas M. Ventilator-Associated Pneumonia: is zero possible? *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1123-1126.
- Klompas M., Kleinman K, Platt R. Development of an algorithm for surveillance of Ventilator-Associated Pneumonia with electronic data and comparison of algorithm results with clinician diagnoses. *Infect Control Hosp Epidem* 2008; 29.
- Klompas M, Khan Y, Kleinman K et al. Multicenter Evaluation of a Novel Surveillance Paradigm for Complications of Mechanical Ventilation. *PLoSOne* 6: e18062.
- Kollef MH. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2691-2693.
- Lampati L, Maggioni E, Langer M et al. Can routine surveillance samples from tracheal aspirate predict bacterial flora in cases of ventilator-associated pneumonia? *Minerva Anestesiol* 2009; 75: 555-562.
- Lin MY, Lyles-Banks RD, Lolans K et al. The importance of long-term acute care hospitals in the regional epidemiology of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis* 2013.
- Martin-Loeches I, Torres A, Rinaudo M, et al. Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organisms. *J Infect* 2015; 74: 213–222.
- Martin-Loeches I, Deja M, Koulenti D, et al. Potentially resistant microorganisms in intubated patients with hospital-acquired pneumonia: the interaction of ecology, shock and risk factors. *Intensive Care Med* 2013; 39: 672–681.
- Micek ST, Chew B, Hampton N, Kollef MH. A case-control study assessing the impact of nonventilated hospital-acquired pneumonia on patient outcomes. *Chest* 2016; 150: 1008-1014.
- Micek ST, Simmons J, Hampton N et al. Characteristics and outcomes among a hospitalized patient cohort with Streptococcus pneumonaie infection. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99: e20145.
- Nseir S. Ventilator Associated Tracheobronchitis *Eur Respir Mon* 2011; 53: 151–159.
- Patel R, Fang FC. Diagnostic Stewardship: Opportunity for a Laboratory-Infectious Diseases Partnership. *Clin Infect Dis*. 2018;67: 799-801. doi: 10.1093/cid/ciy077.
- Prabaker K, Lin MY, McNally M et al. Transfer from high-acuity long-term care facilities is associated with carriage of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a multihospital study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33: 1193-1199.
- Restrepo MI, Peterson J, Fernandez JF, et al. Comparison of the bacterial etiology of early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia in subjects enrolled in 2 large clinical studies. *Respir Care* 2013; 58: 1220–1225.
- Schurinck CA, Van Nieuwenhofen CA, Jacobs JA et al. Clinical pulmonary infection score for ventilator-associated pneumonia: accuracy and inter-observer variability. *Intens Care Med* 2004; 30: 217-224.
- Shorr AF, Fisher K, Micek ST et al. The burden of viruses in pneumonia associated with acute respiratory failure: an underappreciated issue. *Chest* 2018; 154: 84-90.
- Teoli J, Amour S, Danancé C et al. Trends in the proportion of resistant bacteria involved in ventilator-associated pneumonia as the first hospital-acquired infection in intensive care units between 2003 and 2016 in Lyon, France. *Am J Infect Control* 2021; 49:1454-1456.
- Thorburn K, Riordan A. Pulmonary bacterial coinfection in infants and children with viral respiratory infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; 10: 909-916.
- Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, Kollef M, Li Bassi G, Luna CM, Martin-Loeches I, Paiva JA, Read RC, Rigau D, Timsit JF, Welte T, Wunderink R. International

ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). Eur Respir J. 2017 Sep 10;50(3):1700582. doi: 10.1183/13993003.00582-2017.

- Zakhartkina T, Martin-Loeches I., Metamoros s et al. The dynamics of the pulmonary microbiome during mechanical ventilation in the intensive care unit and the association with occurrence of pneumonia. Thorax 2017; 72: 803-810.

D. LA DIAGNOSI MICROBIOLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE

La diagnosi di polmonite, soprattutto della forma nosocomiale, è procedura complessa.
La diagnosi di polmonite non è posta sui dati microbiologici, bensì su quelli anamnestici, clinici, radiologici e sul riscontro di positività dei biomarcatori. Il laboratorio di Microbiologia e Virologia fornisce il nome di un eventuale patogeno che può o meno aver causato la polmonite. Tale approccio diagnostico è sensibile, ma poco specifico, tanto che solo nel 30% circa dei casi in cui – sulla base di questi criteri – è posta la diagnosi di polmonite è poi possibile pervenire ad una conferma di tipo eziologico ricorrendo ad un approccio colturale quantitativo. D'altra parte, si segnala come le tecniche diagnostiche stesse siano gravate da diversa sensibilità in ragione delle possibilità diagnostiche di ogni *setting*.
Di seguito si riportano i quesiti a cui lo specialista di Microbiologia e Virologia clinica deve necessariamente cercare di dare risposta.

Perché effettuare una diagnosi eziologica?
Le finalità della diagnosi eziologica (in particolare per le forme nosocomiali) sono quelle di:

1. applicare idonee strategie di isolamento (es: tubercolosi, SARS-COV-2, RSV, etc.);
2. applicare idonee strategie di prevenzione e di monitoraggio epidemiologico (es. *Legionella*);
3. ottimizzare la terapia antibiotica, inizialmente empirica, attraverso una *pathogen-directed therapy*,
4. favorire un uso più virtuoso degli antibiotici puntando su una strategia terapeutica basata sui risultati degli esami microbiologici di materiali prelevati dalle basse vie aeree rendendo possibile una *de-escalation therapy*;
5. valutare la durata della terapia antibiotica insieme alla risposta clinica;
6. riconoscere la variabilità eziologica da un Centro all'altro, da un reparto all'altro, ed in momenti diversi nello stesso Centro al fine di mettere in atto, su base epidemiologica, schemi di trattamento e di prevenzione ottimali;
7. evitare di non trattare o di trattare in modo inadeguato i casi di HAP, di VAP, perché questo costituisce un fattore rilevante associato ad un incremento della mortalità;
8. trattare adeguatamente tutti i pazienti con HAP sostenute da germi MDR quali gli enterobatteri produttori di *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) o di carbapenemasi, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. o *S. aureus* meticillino-resistente. Di dubbio significato è, in ogni caso, l'eventuale riscontro di *Enterococcus* spp., anche se resistente ai glicopeptidi.

È possibile utilizzare nella diagnosi e nel monitoraggio della terapia marcatori biochimici di infezione?

1. La Proteina C Reattiva (PCR) ad alta sensibilità e la procalcitonina (PCT) sono *marker* di fase acuta, presenti in circolo a basso dosaggio in condizioni di normalità ma largamente incrementati in corso di flogosi acuta. La PCR migliora la *performance* predittiva degli *score* quali il PSI, il CURB 65 ed il CRB 65, anche se il risultato può essere alterato in molti stati infiammatori. La PCT fornisce informazioni precoci e sensibili anche se non consente di differenziare con certezza tra eziologie batteriche e virali. Inoltre, può essere aumentata per patologie batteriche in atto diverse dalla polmonite. Tuttavia, bene correla con il grado di severità espresso da *score* come il PSI, il CURB 65 e il CRB 65 e con il rischio di morte e di complicanze. Il suo utilizzo è oggi finalizzato più alla valutazione prognostica del caso ed all'adeguamento della terapia rispetto che alla diagnosi della polmonite (es: durata della terapia antibiotica, in rapporto al consolidato valore come strumento per *early descalation* o *early withdrawal*). Dati meno consistenti sono disponibili per la valutazione dell'adrenomedullina e della proadenomedullina, che pure sono associate al grado di severità delle CAP, al pari della valutazione del peptide B-natriuretico. Significato differente ha il monitoraggio della troponina-1, correlata con la riduzione dell'ipossiemia;
2. il *test* sierologico per la rilevazione di LRTI virali *vs* batteriche, basato sulla rilevazione combinata della PCR, del TNF-*related apoptosis-induced ligand* (TRAIL) e dell'*interferon-γ-induced protein*-10 (IP-10), consente di discriminare le forme polmonari batteriche da quelle virali soprattutto in età pediatrica con valori di sensibilità del 93,75% e di specificità del 94,2% e PPV pari al 73% e PPN dal 98,9%;
3. promettenti – ma non ancora entrati nell'armamentario diagnostico consolidato – sono la valutazione del *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells* (TREM-1) mediatore della risposta immune dell'ospite per l'attivazione della sintesi di citochine proinfiammatorie e dell'Endocan, un nuovo marcatore nel danno endoteliale, secreto specificamente dalle cellule attivate dell'endotelio vascolare polmonare, predittivo dell'insufficienza respiratoria nei pazienti politraumatizzati o con sepsi.

Quali sono i presupposti primari per l'impostazione di corretti schemi di accertamento diagnostico?

1. ricordare che le indagini microbiologiche non devono ritardare l'inizio della terapia antibiotica empirica, soprattutto nel paziente con sepsi/*shock* settico e/o grave insufficienza respiratoria dovuta al quadro polmonare acuto;
2. ricordare che, oltre ad eseguire *test* diagnostici di base, le indagini devono essere mirate sulla base di riscontri clinico-radiologici ed epidemiologici contingenti.

Quali sono i punti critici della diagnosi eziologica?

1. La disponibilità di un campione rappresentativo della sede anatomica di infezione (identificata preferibilmente mediante CT del torace quando clinicamente indicata) e non contaminato, prelevato possibilmente in periodo precedente alla somministrazione di antibiotici;
2. il ricorso a strategie di laboratorio integrate, che considerino l'esame microscopico diretto e l'esame colturale semiquantitativo o – meglio – quantitativo per le indagini batteriologiche e micologiche;
3. l'opportunità di ricorrere a *test* cosiddetti "sindromici" per la diagnosi di infezione ad eziologia batterica, fungina e virale.

Quando devo ricorrere a test eseguiti con metodo molecolare?

1. quando, localmente, vi è la disponibilità: strumentale, economica e di personale;
2. per le forme clinicamente critiche: pazienti degenti con CAP grave (particolarmente se ricoverati in Terapia Intensiva), con VAC oppure VAP all'esordio, oppure in trattamento con *ExtraCorporeal Membrane Oxygenation* (ECMO), anche se gravemente immunocompromessi.

Infine, sulla base di quanto sinora descritto, va rammentato che in tutti i casi di CAP è opportuno che in occasione della prima visita sia svolta dal clinico curante un'accurata anamnesi epidemiologica del paziente, volta a rilevare alcune condizioni associate e ad indirizzare l'accertamento di diagnosi microbiologica in modo mirato.

Per tale motivo è utile che l'esame anamnestico verifichi l'esistenza di epatopatie severe, di splenectomia, di abuso di alcol, ed accerti soggiorni in albergo, in stazioni termali, ospedali ambulatori medici, case di riposo oppure confermi l'effettuazione di viaggi nell'ultimo mese, frequentazione di grotte, contatti con uccellini o con altri animali da compagnia o da cortile o con persone con sintomi respiratori.

È fondamentale che tali dati anamnestici siano comunicati allo specialista di Microbiologia e Virologia perché possa organizzare al meglio le procedure analitiche di volta in volta più appropriate.

E. LE MODALITÀ DELLA DIAGNOSI MICROBIOLOGICA

Il ricorso ad un approccio di diagnosi eziologica, ricorrendo a colture quantitative, ha una documentata utilità soprattutto in quei pazienti per i quali il sospetto diagnostico su base clinica è modesto. Per questo è necessario evitare ogni ritardo nell'effettuazione dei prelievi, che devono essere eseguiti, compatibilmente con la situazione clinica di ogni singolo paziente prima dell'inizio di una (nuova) terapia antibiotica.
Al momento del riscontro di un quadro di polmonite grave ospedalizzata, sia comunitaria che nosocomiale, è opportuno procedere all'esecuzione di emocolture (2-3 *set*): esse risultano positive, rispettivamente in circa l'11% e il 25% dei casi. Per l'esecuzione e la gestione delle emocolture si rimanda al percorso diagnostico "Infezioni del torrente circolatorio" reperibile nel sito AMCLI.
I materiali più significativi per l'analisi microbiologica si ottengono preferibilmente con prelievo da polmone profondo (dai bronchi segmentari o sub-segmentari, dove la contaminazione da saliva è improbabile) meglio se guidati da una TC del torace.
Il prelievo può essere effettuato attraverso broncoscopio (guidato) o con appositi cateteri "alla cieca". Preferibilmente il prelievo dovrà essere effettuato con un catetere "protetto" (essendo dotato di una doppia camera, dopo l'introduzione si estrae il catetere interno, protetto e sterile nella sede dell'infezione identificata dalla CT del torace eseguita in precedenza) o, in alternativa, con un catetere "non protetto". Nonostante le notevoli differenze tra le due metodologie, non è stato possibile stabilire con certezza quale sia la tecnica di prelievo migliore, mentre ci sono pochi dubbi sul fatto che l'esame microbiologico debba essere eseguito con modalità quantitativa e che per ogni tipo di campionamento debba essere definita una soglia di significatività della carica microbica identificata. Le linee guida (2013) della BTS sulle indicazioni diagnostiche della broncoscopia flessibile (FBS) affermano che la FBS è una procedura utile quando metodi di diagnosi meno invasivi non riescono a dare una risposta eziologica certa in caso di

sospetta infezione polmonare, con la consapevolezza che lo spettro di infezioni possibili è diversa tra soggetti immunocompetenti e immunocompromessi.
Per quanto riguarda la diagnosi eziologica delle infezioni virali, l'indagine colturale risulta intempestiva, indaginosa ed incompleta. Metodiche oggi molto più efficaci sono l'identificazione diretta di antigeni o, soprattutto, di acidi nucleici virali nei campioni clinici. Le metodiche molecolari risultano più affidabili e riproducibili, e sono in grado di identificare un maggior numero di agenti patogeni in modalità anche quantitativa. La necessità di pannelli diagnostici specifici per la diagnosi di infezione da virus respiratori che tengano conto della stagionalità e della diversa distribuzione geografica e di pannelli specifici per virus opportunistici è oggi ampiamente dibattuta.

E1 LA FASE PRE-ANALITICA

È responsabilità del Laboratorio di Microbiologia dare indicazioni per un prelievo accurato: solo un campione di buona qualità pone le premesse per un risultato di buona qualità in termini biologici e clinici. Anche la proposta del materiale da prelevare e, successivamente, da processare dovrebbe essere concordata dal clinico con il laboratorio di Microbiologia e Virologia, alla luce della significatività prevista delle procedure analitiche. È fondamentale ricordare che il prelievo dei campioni deve essere effettuato a partire dalle basse vie respiratorie, possibilmente prima dell'inizio della terapia antibiotica, che deve poi essere immediatamente iniziata nei pazienti critici.
Per ottimizzare la raccolta del campione e l'esecuzione dell'esame colturale è indispensabile la stretta collaborazione e lo scambio di informazioni tra microbiologo e medico curante: il laboratorio di Microbiologia e Virologia dovrebbe essere informato in anticipo, prima che il prelievo sia eseguito, dell'invio di materiali raccolti con metodiche invasive. Inoltre, l'affidabilità del risultato microbiologico è proporzionale anche all'esperienza dell'operatore-endoscopista che procede al prelievo.

La scelta del campione biologico deve essere effettuata sulla base delle caratteristiche cliniche del paziente e delle possibilità tecniche disponibili nella sede ospedaliera locale.
L'allegato 1 riporta le modalità di prelievo dei campioni respiratori.

È, tuttavia, necessario ricordare che, ove possibile, alla raccolta di campioni ad alto rischio di contaminazione salivare (espettorato; espettorato indotto; espettorato protetto; aspirato endotracheale; aspirato da tracheostomia; lavaggio bronchiale o broncoaspirato) devono essere preferiti campioni a basso rischio di contaminazione con saliva (aspirato transcricoideo; aspirato endotracheale/bronchiale; lavaggio broncoalveolare, BAL; spazzolatura endobronchiale protetta; BAL mirato con cateterino; *plugged telescoping catheter,* PTC).

Si segnala che – ove non sia possibile ricorrere a tecniche di prelievo protette - tra le metodiche non protette di prelievo deve essere preferita quella dell'espettorato indotto. L'allegato 2 riporta un modello per l'esplicazione di note da consegnare, laddove possibile, al paziente per la raccolta dei campioni.

Si segnala che, in caso di soggetti affetti da fibrosi cistica con riscontro di bronchiectasie su HRCT, non sempre è agevole effettuare prelievi con tecniche protette, praticate tuttavia nei Centri di Riferimento clinici. È opportuno considerare in questi pazienti che materiali respiratori idonei per la processazione analitica sono anche l'espettorato nel paziente adulto e nel bambino grande, oppure l'aspirato rinofaringeo profondo nel bambino piccolo che non espettora.

Molto si discute se la modalità di prelievo debba prevedere l'ausilio della visione diretta endoscopica o se possa essere "alla cieca": i dati più recenti della letteratura, pur raccomandando la prima modalità, non la considerano obbligatoria. I campioni, tuttavia, devono essere finalizzati all'esecuzione di colture quantitative, assai più utili clinicamente di quelle semiquantitative.
Per tutti valga l'esempio dei campioni prelevati con modalità non protette: si noti come la coltura qualitativa dell'aspirato tracheale sia di scarsissimo ausilio, se non per il valore predittivo negativo (se effettuato in assenza di antibiotici): la sensibilità risulta >75% ma la specificità è <25%, mentre la coltura quantitativa dello stesso materiale respiratorio è accettabile, con sensibilità del 70-80% e specificità pari al 70%.

La diagnosi di polmonite microbiologicamente documentata si basa sui risultati quantitativi delle colture di materiali respiratori prelevati da sedi distali con/senza broncoscopio:

* aspirato endotracheale
* lavaggio broncoalveolare
* spazzolato bronchiale

associate alle emocolture ed alla coltura del liquido pleurico, qualora clinicamente indicata.

È opportuno procedere al prelievo di materiali respiratori distali (con metodica invasiva) quando vi sia garanzia che i risultati siano disponibili in tempi seriali (microscopia ed - eventualmente - test molecolare: in giornata; coltura: 18 ore; antibiogramma: 48 ore) e quando vi sia la "fiducia" dei curanti nelle capacità del laboratorio. Nei pazienti intubati è opportuno preferire il prelievo distale protetto all'aspirato tracheale.
Il materiale biologico deve essere inviato al laboratorio di Microbiologia e Virologia il più rapidamente possibile (e comunque, possibilmente, non oltre 2 ore dalla raccolta) previa conservazione a temperatura ambiente. Solo se la consegna tempestiva non è possibile, è consentita la conservazione fino a 24 ore a +4°C. Si segnala che la lidocaina ed altri anestetici possiedono attività antibatterica, al pari della formalina, e la conservazione a bassa temperatura limita il recupero di *S. pneumoniae*.

Ove non si consideri la possibilità di ricerche mirate, il protocollo delle indagini colturali sarà finalizzato alla ricerca dei microrganismi non esigenti e di quelli microaerofili (protocollo "*standard*"). Pare opportuno segnalare l'opportunità di procedere alla ricerca dei patogeni di seguito indicati in tabella eseguendo, laddove indicato, anche le indagini sierologiche da richiedere obbligatoriamente nei casi non rispondenti alla terapia empirica di prima linea:

QUADRO CLINICO	RICERCHE "MICROBIOLOGICHE"	*TEST* MOLECOLARI	*TEST* SIEROIMMUNOLOGICI
Polmonite comunitaria: - nel bambino	• protocollo *standard* (incluso: *S. agalactiae* se bimbo < 30 giorni di età) • *B. pertussis* e *B. parapertussis* • virus respiratori	• *C. pneumoniae* • *C. trachomatis* • *H. influenzae* • *M. pneumoniae* • *S. pneumoniae*	• *C. pneumoniae* • *C. trachomatis* • *M. pneumoniae*
- nell'adulto: *in immunodepresso (preferenza a: BAL)	• protocollo *standard* • *Nocardia* spp • *Mycobacterium* spp. (atipici) • *P. jirovecii* • miceti filamentosi • virus opportunisti • virus respiratori	• *C. pneumoniae* • *C. trachomatis* • *H. influenzae* • *M. pneumoniae* • *S. pneumoniae*	• *C. pneumoniae* • *C. trachomatis* • *L. pneumophila* • *Aspergillus* spp.
* in viaggiatore internazionale	• protocollo *standard* • batteri a seconda della epidemiologia locale • miceti dimorfi • virus respiratori (a seconda della stagionalità e della distribuzione geografica; se anamnesi positiva per contatti, virus eventualmente endemo-epidemici nella regione visitata (es. MERS-CoV)		• *H. capsulatum* • *C. immitis/ posadasii*
* in fibrosi cistica ed altre patologie strutturali del polmone	• protocollo *standard* • *B. cepacia complex,* • miceti filamentosi • virus respiratori	• *M. pneumoniae* • *C. pneumoniae*, • RSV	• *M. pneumoniae* • *pneumoniae*, • RSV
* a contatto con animali:	• protocollo *standard* • *P. multocida*, *R. equi*	• *C. burnetii*	• *C. psittaci* • *Leptospira* spp., • *C. burnetii*
* BPCO	• protocollo *standard* • *Aspergillus* spp. • *M. tuberculosis* e micobatteri atipici • *Nocardia* spp.	• *M. pneumoniae* • *C. pneumoniae*	• *M. pneumoniae* • *C. pneumoniae*
Polmonite nosocomiale:			
in paziente ventilato	• protocollo *standard* • miceti filamentosi • virus respiratori	• *M. pneumoniae* • *C. pneumoniae,* • *L. pneumophila*	• *M. pneumoniae* • *C. pneumoniae,* • *L. pneumophila*
in paziente in *Stroke Unit* ed in caso di *ab ingestis*	• protocollo *standard* • anaerobi		

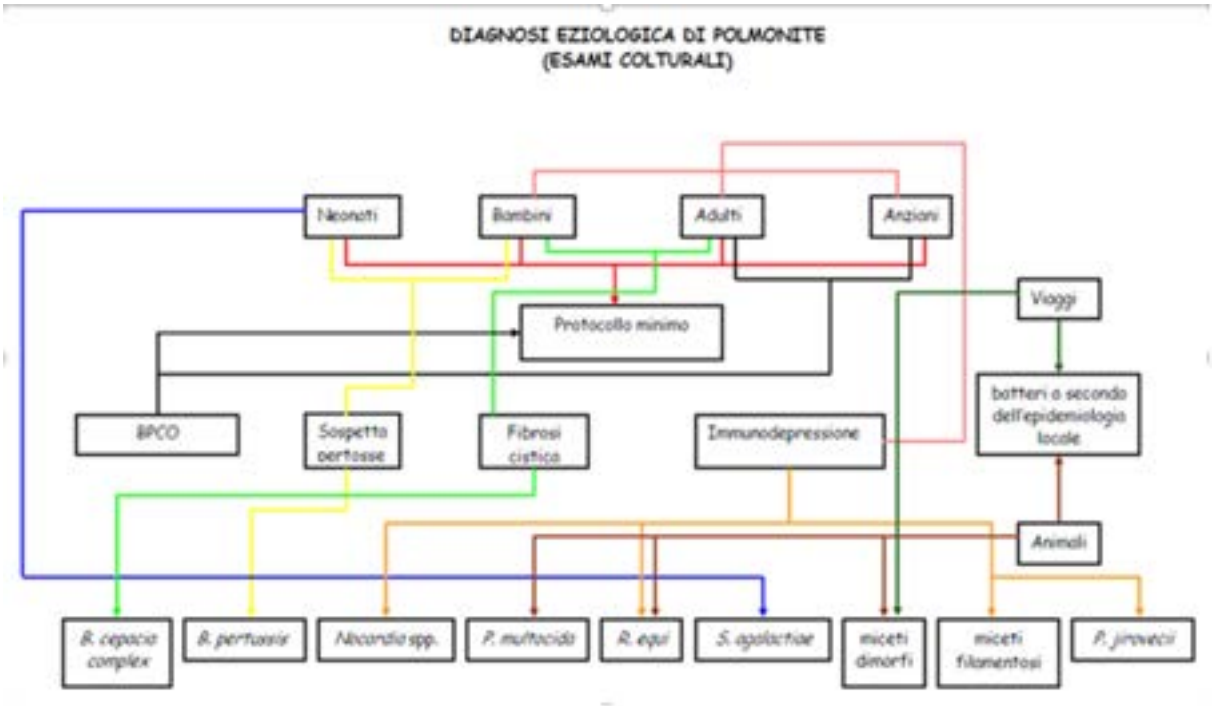
È superfluo ricordare che le modalità di conservazione e di invio dei campioni biologici è stringente, pena l'impossibilità di recuperare in coltura i microrganismi *fastidious* e gli anaerobi.

In particolare, al momento del riscontro di un quadro di polmonite comunitaria ospedalizzata è opportuno procedere all'esecuzione di *test* specifici, riassunti nelle *flow chart* operative riportate nell'allegato 2:

- antigene (da campione urinario) di *Legionella pneumophila* (obbligatoriamente di tipo 1, possibilmente anche di tipo 2-14) e di *S. pneumoniae*, con tecnica immunocromatografica (IC), in immunofluorescenza (IFA) o con tecnica immunoenzimatica (EIA). Metanalisi confermano che tali *test*, in uso ormai da decenni, sono peraltro caratterizzati da sensibilità dell'80% circa e specificità del 95% circa per pneumococco e legionella rispettivamente. Si segnala tuttavia che in età pediatrica la ricerca dell'antigene urinario di pneumococco ha significato solo modesto se non associato alla valutazione sierica di PCR o PTC.

Si segnala inoltre che la ricerca dell'antigene di *L. pneumophila* deve essere riservata ai casi di CAP severa o enigmatica, in caso di fallimento di terapie con beta-lattamici, in pazienti in ICU, per quelli che presentano specifici fattori di rischio e durante le epidemie. In caso di positività dell'Ag urinario per *Legionella* e/o pneumococco è necessario richiedere l'invio al laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica di un campione respiratorio, se non ancora disponibile, e quindi procedere alla semina di un'aliquota del campione di materiale respiratorio rispettivamente su Agar Sangue (incubato in microaerofilia) e su terreni selettivi per *Legionella*;

- anticorpi circolanti di *L. pneumophila* con tecnica EIA o IFA: il siero prelevato al momento del sospetto diagnostico non deve essere processato, ma conservato in sieroteca per essere esaminato contestualmente a quello prelevato dopo 21 giorni per accertare un'eventuale legionellosi. Questo approccio diagnostico sierologico ha, ovviamente, solo valore epidemiologico;
- nel caso il paziente con CAP sia ricoverato in un reparto di Terapia Intensiva è opportuno il ricorso all'esecuzione di un *test multiplex* che consenta la rilevazione almeno di *Legionella* spp., *S. pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* con metodo molecolare sindromico, possibilmente con la possibilità di stimare in modo semiquantitativo le copie genomiche. In caso di positività per pneumococco o per *Legionella* è opportuno richiedere l'invio di un campione respiratorio e poi procedere alla semina di un'aliquota del campione di materiale respiratorio rispettivamente su Agar Sangue (incubato in microaerofilia) e su terreni selettivi per *Legionella*. Si segnala tuttavia che in età pediatrica la ricerca dell'antigene urinario di pneumococco ha significato solo modesto, se non associato alla valutazione sierica dei marcatori di infezione (PCR o PCT). Il riscontro
- di valori elevati dei marcatori sierici dell'infiammazione e di positività dell'antigene pneumococcico urinario è altamente predittivo per una polmonite da pneumococco in età pediatrica. Si segnala inoltre che la ricerca degli antigeni di *L. pneumoniae* - ed eventualmente di *S. pneumoniae* - deve essere riservata ai casi di CAP moderata/severa o enigmatica, in caso di fallimento di terapie con beta lattamici, in pazienti in ICU, per quelli che presentano specifici fattori di rischio ed in quelli che soddisfano alcuni dati epidemiologici (ad esempio: durante le epidemie, soggetti provenienti da alberghi e/o comunità).



Nei pazienti con fibrosi cistica o altre patologie strutturali del polmone è opportuno prevedere – oltre che prelievi per la definizione eziologica delle riacutizzazioni – anche controlli su base trimestrale, finalizzati soprattutto alla ricerca di *P. aeruginosa,* di *B. cepacia complex*, di *S. aureus* e di miceti filamentosi.

Ancora, al momento del riscontro di un quadro di polmonite nosocomiale è opportuno procedere all'esecuzione sistematica di emocolture (2-3 *set*, in accordo con quanto indicato nel Percorso diagnostico AMCLI ETS "Infezioni del torrente circolatorio") e di *test* per la definizione di:

- infezione da *Legionella* spp. e *S. pneumoniae*:
  - antigene (da campione urinario) di *Legionella pneumophila* (obbligatoriamente di tipo 1, possibilmente anche di tipo 2-14) e di *S. pneumoniae*, con tecnica immunocromatografica (IC), in immunofluorescenza (IFA) o con tecnica immunoenzimatica (EIA). Tali indagini, giustificate in caso di CAP grave, non trovano al contrario indicazione in caso di HAP in assenza di chiaro sospetto clinico/epidemico (in questo caso può essere giustificato il ricorso a metodi di indagine molecolare). Metanalisi confermano che tali *test*, in uso ormai da decenni, sono peraltro caratterizzati da sensibilità dell'80% circa e specificità del 95% circa per pneumococco e legionella rispettivamente.
  - genoma di *L. pneumophila* e/o di *S. pneumoniae* inclusi in un pannello sindromico: in caso di positività per *Legionella* spp. è opportuno procedere alla semina di un'aliquota del campione di materiale respiratorio su terreni selettivi per *Legionella*;
- infezione da altri microrganismi: il paragrafo E2 riporta le indicazioni e le modalità operative.

All'arrivo presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica è necessario procedere, per quanto possibile, alla verifica della correttezza con cui la fase pre-analitica (raccolta, conservazione ed invio del materiale) è stata effettuata.
L'allegato 3 riporta la descrizione delle procedure tecniche per la diagnosi eziologica.

E2. LA DIAGNOSI BATTERIOLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE

E2.1 L'ESAME MICROSCOPICO DIRETTO

L'osservazione microscopica diretta del materiale respiratorio riveste un duplice ruolo: 1. verifica dell'idoneità del campione (se rappresentativo, cioè, delle basse vie respiratorie, senza contaminazione salivare. Nel caso dei materiali prelevati con tecniche non protette è imperativo effettuare la determinazione del Q *score* in accordo con Bartlett *et al*. (1998) e 2. dimostrazione dei morfotipi microbici presenti, indicativa, di una possibile eziologia.

L'osservazione microscopica diretta del materiale respiratorio è utile (previa citocentrifugazione, se si dispone di citocentrifuga) in ogni caso: un campione di lavaggio broncoalveolare che mostri la presenza >1% di cellule squamose depone per un prelievo non correttamente eseguito e, in quanto potenzialmente contaminato con materiale orale, di significato microbiologico e clinico ambiguo. Al contrario, il riscontro di cellule cigliate è indicativo del fatto che il materiale proviene dalle basse vie respiratorie.

Inoltre, l'esame microscopico – effettuato sottoponendo il campione a colorazione di Gram (e, in casi mirati, anche di Kinyoun o Auramina-rodamina per micobatteri, di Ziehl-Nielsen modificato per *Nocardia* spp., di Gomori-Grocott o PAS per miceti, di fluorescenza diretta per *Legionella* spp., Cytomegalovirus, virus respiratori o *Pneumocystis jirovecii*) consente di evidenziare la presenza di morfotipi microbici predittivi del microrganismo eventualmente riscontrato in coltura: la lettura (eseguita a x100 e x1000) consente di rilevare la presenza di batteri extracellulari (definendone la carica semiquantitativa) ed intracellulari (registrando la percentuale di polimorfonucleati e macrofagi contenenti microrganismi intracellulari). La presenza di batteri intracellulari o adesi alle pareti delle cellule in percentuale >5% è indicativa di polmonite sostenuta dal morfotipo microbico osservato. L'attendibilità di tale riscontro equivale a quello di una coltura quantitativa. D'altra parte, la negatività dell'esame microscopico non esclude *tout court* la polmonite, per la scarsa sensibilità dell'esame microscopico dopo colorazione di Gram.

I risultati dell'esame microscopico devono essere riferiti tempestivamente, con una refertazione preliminare, anche e soprattutto se il materiale non risulta idoneo all'indagine microbiologica.

E2.2 L'ESAME COLTURALE

L'esame colturale dei materiali respiratori prelevati con metodiche protette costituisce il passaggio fondamentale per l'accertamento eziologico: è necessario che il Laboratorio metta in atto procedure tecniche atte a valutare quantitativamente i risultati analitici.
Il campione non necessita sempre del pretrattamento di fluidificazione: tale primo intervento deve essere valutato in base alle caratteristiche del singolo campione biologico. In presenza di materiale emorragico può essere utile procedere alla lisi degli eritrociti (che pure, tuttavia, diluisce il materiale patologico originario).
Anche in questo caso le indagini (per la ricerca diretta di ricerca di batteri e miceti) prevedono un protocollo minimo di ricerche colturali, associate però alla determinazione quantitativa della carica batterica. Il campione, sottoposto ad esame colturale, deve essere interpretato dopo 24 e 48 ore di incubazione.
Ove non sussistano – a seguito di condizioni epidemiologiche particolari - sospetti eziologici mirati, il laboratorio di Microbiologia provvede a mettere in atto un protocollo di

ricerca colturale *standard*, finalizzato sostanzialmente alla ricerca di microrganismi a rapida crescita (*Enterobacterales*, bacilli Gram-negativi non fermentanti il glucosio, *M. catarrhalis, S. aureus, S. pneumoniae* e *S. pyogenes*) o esigenti (*Haemophilus* spp.). La ricerca dei batteri anaerobi dovrebbe essere riservata ai casi di sospetta polmonite *ab ingestis*. La ricerca di *Legionella* spp. è imperativa in caso di positività dei *test* di rilevazione dell'antigene urinario o del genoma microbico.

Nel caso di sospetto clinico basato su dati clinico-epidemiologici particolari (viaggi internazionali, contatti con animali, soggetti con fibrosi cistica, ospite immunodepresso) è necessario predisporre ricerche mirate, ricorrendo a terreni selettivi e differenziali ed a modalità di incubazione protratte indispensabili per la evidenziazione di microrganismi particolarmente esigenti, quali ad esempio *Nocardia* spp, *R. equi* e *B. cepacia* o miceti filamentosi.

L'interpretazione del risultato deve tenere conto delle modalità operative adottate in base al materiale processato, ricordando che la quantificazione della carica microbica deve essere opportunamente valutata sulla base del fattore di diluizione utilizzato.
Qualora si proceda alla coltura di materiali distali prelevati con procedure protette - poiché si tratta di materiali provenienti da distretti fisiologicamente sterili - è necessario procedere all'identificazione di tutti i microrganismi, dal momento che non è possibile escluderne in alcun caso – *a priori* – il ruolo patogeno, a meno che non sia evidente una flora caratteristica del cavo orale, indice di una contaminazione del prelievo da parte della flora commensale come risultato, ad esempio, di una procedura di raccolta difficoltosa e quindi non corretta.

La valutazione quantitativa è obbligatoria, e l'interpretazione dei i risultati della coltura dei materiali raccolti con metodiche protette deve tenere conto che per la spazzola endobronchiale (PSB, *Protected Specimen Brush*) o per i prelievi effettuati con la metodica PTC, in assenza di terapia antibiotica o con terapia antibiotica invariata da >3 giorni la carica critica è indicata in $>10^3$ CFU/mL; per il lavaggio broncoalveolare la carica critica è indicata in $\geq 10^3$ UFC/mL (tale valore è stato desunto dalla comparazione con la coltura di frustoli bioptici di tessuto polmonare di 1 mm^3). Ciò si correla con i valori di sensibilità e di specificità di seguito indicati, e con una concordanza autoptica >70%:

PRELIEVI BRONCOSCOPICI	SENSIBILITÀ (%)	SPECIFICITÀ (%)
Lavaggio bronco-alveolare	73 ± 18	82 ± 19
Spazzolato bronchiale	66 ± 19	90 ± 15

Il dato anamnestico di una precedente terapia antibiotica comporta l'adozione di diversi criteri interpretativi della carica microbica. In caso di terapia chemioantibiotica iniziata recentemente (≤3 giorni), anche cariche batteriche $\leq 10^2$ CFU/mL potrebbero essere significative.
In caso di raccolta del materiale da lavaggio bronco-alveolare mirato con cateterino e palloncino (Pro-BAL) è necessario interpretare i risultati salendo di un logaritmo. La carica critica è quindi indicata in $>10^5$ CFU/mL.

Dati recenti della letteratura evidenziano tuttavia la validità del ricorso a strategie non invasive di prelievo, ad esempio utilizzando aspirati endotracheali. Anche in questo caso

è imperativo effettuare colture quantitative, giacché la sola interpretazione qualitativa non consente di discriminare i microrganismi commensali, riducendo di molto il VPP della coltura. La carica critica per l'aspirato endotracheale è indicata in $>10^6$ UFC/mL.

E2.3 L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Essendo spesso verificata la presenza di polimicrobismo nelle colture, solo la determinazione quantitativa della carica microbica costituisce il criterio interpretativo che consente di riconoscere il patogeno nel contesto di una popolazione mista.
Gli agenti eziologici di polmonite sono generalmente presenti in alte concentrazioni nelle secrezioni respiratorie ($\geq 10^5$-10^6 UFC/mL) e nei tessuti ($\geq 10^4$ UFC/g di tessuto), mentre la popolazione microbica contaminante delle alte vie superiori è presente in concentrazioni più basse ($<10^4$ UFC/mL) quando il materiale è prelevato correttamente. La determinazione della carica batterica aiuta così a discriminare i microrganismi responsabili di infezione da quelli più probabilmente contaminanti.

Questi due criteri di analisi microbiologiche (esame microscopico diretto ed esame colturale) sono inclusi anche nei criteri di costruzione del *Clinical Pulmonary Infection Score* (CPIS), anche se, in realtà, diverso – nel tempo – è stato il loro utilizzo.
Numerosi dati di letteratura sono disponibili in merito alla comparazione dell'accuratezza del CPIS con la diagnosi microbiologica: le conclusioni sono spesso discordanti, con ampio *range* di sensibilità e di specificità complessive. Tuttavia, l'esclusione del criterio microbiologico dalla costruzione del CPIS comporta valori di sensibilità diagnostica dell'83% ma di specificità solo del 17%.

La negatività della coltura di secrezioni respiratorie in assenza di un nuovo antibiotico inserito nello schema terapeutico nelle ultime 72 ore precedenti il prelievo di materiale patologico esclude virtualmente la presenza di una polmonite batterica (VPN: 94%). Infezioni virali, da *Legionella* e da altri patogeni "atipici" compresi *M. pneumoniae* e *C. pneumoniae*, non possono, tuttavia, essere escluse. In caso di soggetti affetti da fibrosi cistica il riscontro di *S. aureus, P. aeruginosa* e *B. cepacia* è clinicamente significativo qualunque sia la carica microbica. L'allegato 5 riporta alcuni modelli di note codificate di commento al referto.

E2.4 I *TEST* MOLECOLARI

L'utilizzo di *test* molecolari cosiddetti sindromici consente la diagnosi rapida, sensibile e specifica di numerosi microrganismi responsabili di LRTI: batteri, miceti e virus. Essi sono particolarmente indicati per l'accertamento di microrganismi per i quali le colture sono difficili o desuete e gli approcci tradizionali, in particolare di sierologia infettivologica, sono di modesta qualità analitica in termini di sensibilità e specificità: batteri quali *Chlamydophila pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, ed – in genere – i virus.

Il ricorso a *test* molecolari riduce da 96 ore circa a 4 ore (e anche meno, con il ricorso a *test* singoli da riservare a casi di estrema urgenza) la diagnosi clinica, consentendo l'adeguamento dello schema terapeutico entro 6 ore nel 67% dei casi, dimostrando l'efficacia della *diagnostic stewardship* nell'ambito della più ampia *antimicrobial stewardship*.

I *test* molecolari per la diagnosi eziologica delle LRTI soprattutto ad eziologia batterica e micotica devono essere, comunque, considerati complementari – e non sostitutivi – dei

test della Microbiologia tradizionale, non fosse altro che i pannelli oggi disponibili non coprono lo spettro totale dei microrganismi potenzialmente implicati in caso di polmonite, così che un referto di negatività non può escludere *tout court* la presenza di un agente patogeno. D'altro canto, sebbene recentemente contestato da Markussen *et al* (2023), ancora un risultato di positività deve sempre essere interpretato alla luce della qualità del campione analizzato: se proveniente dalle basse vie respiratorie, se prelevato in sede polmonare distale con metodo protetto, se contaminato – come evidenziabile dall'esame microscopico diretto del campione – con saliva abitata dai microrganismi residenti nel cavo orale.

Tali *test* si caratterizzano, quindi, per sostanziali benefici rispetto all'approccio diagnostico tradizionale essendo, tuttavia, ancora caratterizzati da limiti che ne inficiano l'utilizzo generalizzato: costi ancora oggi elevati, rischio di iper-utilizzo e difficoltà interpretative soprattutto se non utilizzati con appropriatezza prescrittiva ed accortezza interpretativa. Per tale motivo si segnala che la loro esecuzione deve essere riservata a pazienti – come sono quelli con CAP severa oppure immunodepressi - che presentano fattori di rischio e gravità prognostica significativi, che la loro positività può perdurare a lungo dopo la risoluzione del quadro clinico (per tale motivo non è giustificata la ripetizione del *test* per la valutazione del *follow-up* del quadro clinico) e che è necessario valutare – prima della refertazione – l'accurata valutazione delle curve di *melting* e dei Ct al fine di correttamente interpretare la positività in caso del riscontro multiplo di germi diversi. In questo caso, d'altra parte, l'interpretazione da parte del clinico deve essere finalizzata all'inizio o meno ed alla sospensione o meno di terapie mirate antibatteriche, antifungine oppure antivirali associate, di converso, alla riduzione di *test* aggiuntivi, inclusi quelli di diagnostica per immagini, e della durata della degenza.

E2.5 I *TEST* DI ANTIBIOTICO-SENSIBILITÀ

La diagnosi rapida dei microrganismi e della resistenza agli antibiotici è vitale per il trattamento appropriato dei pazienti con infezioni delle basse vie respiratorie, in particolare per i pazienti in terapia intensiva.
Negli ultimi anni sono stati sviluppati sistemi diagnostici molecolari che permettono, in poche ore, di rilevare i principali microrganismi patogeni e alcuni tra i principali determinanti di resistenza. L'utilizzo di questi *test* è fortemente supportato nei *setting* ad alta circolazione di germi MDR.

E2.5.1 I *TEST* DIRETTI FENOTIPICI

I dati di letteratura suggeriscono il ricorso al *test* di determinazione della MIC con metodo di agar diffusione mediante gradiente di concentrazione (Epsilometer *test*) direttamente da BAL con lettura a 10 e 24 ore di incubazione.
Gli utilizzatori di questo approccio dovrebbero tener conto dell'eventuale presenza di una popolazione polimicrobica e della possibilità di ottenere risultati falsamente sensibili con questa metodica rispetto alla coltura tradizionale.
L'esecuzione di *test* fenotipici per la valutazione dell'antibioticosensibilità a partire direttamente dal campione biologico è una pratica non standardizzata che può essere utilizzata in due condizioni cliniche: la polmonite in soggetti affetti da fibrosi cistica e la VAP, in particolare eseguendo *test* di determinazione della MIC con metodo di agar diffusione a gradiente di concentrazione (Epsilometer *test*). In entrambi i casi, i dati di letteratura mostrano, almeno per la metà dei pazienti, un vantaggio nel ridurre l'esposizione ad una terapia antibiotica ad ampio spettro e il passaggio più rapido ad una

terapia antibiotica appropriata. Sebbene sia necessaria una certa esperienza da parte dell'operatore, Boyer A *et al* evidenziano un *outcome* più favorevole – in termini di durata della febbre, durata della somministrazione di antibiotici e comparsa di diarrea da *Clostridioides difficile* – tra i soggetti per i quali fossero stati resi disponibili i dati preliminari di sensibilità. Gli utilizzatori di questo approccio dovrebbero tener conto dell'eventuale presenza di una popolazione polimicrobica e della possibilità di ottenere risultati falsamente sensibili con questa metodica rispetto alla coltura tradizionale. D'altra parte, il metodo non è riconosciuto da EUCAST che prevede l'utilizzo di *test* fenotipici rapidi solo per isolati in caso di sepsi. Per quanto descritto, quindi, il *test* non è raccomandato se non per valutazioni del tutto solo orientative.

E2.5.2 I *TEST IN VITRO*

I *test* di chemiosensibilità devono essere effettuati a partire da colonie isolate in accordo con l'identificazione colturale presuntiva. Si segnala che i metodi automatizzati, al pari del tradizionale metodo in *agar* diffusione secondo Kirby & Bauer, possono produrre risultati non corretti qualora siano eseguiti su batteri a lenta crescita.
L'esecuzione dell'antibiogramma deve essere affiancata alla determinazione della MIC ed a *test* di conferma dallo studio per la produzione di beta-lattamasi/carbapenemasi.
L'attuale problematica dell'antimicrobicoresistenza osservata in microrganismi responsabili di infezioni delle basse vie respiratorie implica l'utilizzo di nuovi antibiotici (es. cefiderocol, meropenem-vaborbactam, fosfomicina, ecc.) e pone l'attenzione sulla corretta determinazione della sensibiità verso queste molecole attraverso l'uso delle diverse metodiche attualmente disponibili, microdiluizione in brodo, agar diluizione e diffusione in agar (EUCAST 2024).
Per allestimento dei *test* di sensibilità e l'interpretazione degli *endpoint* ottenuti occorre riferirsi, a seconda del microrganismo e della molecola antibatterica da testare, alle linee guida EUCAST 2024.
In presenza di microrganismi MDR, l'esecuzione dei *test* di sensibilità *in vitro* agli antimicrobici deve essere affiancata dalla determinazione di eventuali meccanismi di resistenza trasmissibili per scopi epidemiologici e di *infection control*.

L'utilizzo di pannelli sindromici permette, da campione clinico, di ottenere risultati di positività o negatività per la presenza dei più diffusi determinanti di resistenza nei patogeni di maggior impatto clinico (MRSA, VRE, enterobatteri e/o bacilli Gram-negativi non fermentanti). I geni di resistenza correlabili ai profili di antibiotico-resistenza a cefalosporine di terza generazione e carbapenemi più spesso rilevati sono: $_{bla}$CTX-M, $_{bla}$KPC, $_{bla}$VIM/IMP/NDM, $_{bla}$OXA-48-*like*). Il risultato dell'"antibiogramma molecolare" - vantaggioso rispetto al solo fenotipico per rapidità e rilevazione di resistenza acquisita di importanza clinico-epidemiologica - deve essere sempre affiancato a quello relativo ai *test* di antibiotico-sensibilità tradizionali. La ricerca di questi determinanti di resistenza può essere effettuata con metodiche molecolari (PCR, sequenziamento genico, …) o con metodiche fenotipiche (*lateral flow immunoassay*, *test* di approssimazione o di combinazione in agar diffusione, …).

In caso di infezione polmonare documentata in soggetti affetti da fibrosi cistica si raccomanda l'esecuzione dei *test* di sensibilità con metodi manuali su tutti i morfotipi differenti (mucoidi, rugosi, lisci, nani) cui corrispondono genotipi identici, ma differenti antibioticosensibilità.

In caso di polmonite nosocomiale può essere opportuno - in casi specifici, soprattutto in presenza di microrganismi MDR - procedere allo studio dell'attività per associazioni chemioantibiotiche, con la determinazione del *Fractional Inhibitory Concentration* (FIC) *index*. Anche in questo caso non esistono, tuttavia, procedure standardizzate riconosciute da organismi internazionali.

E2.5.3 I *TEST IN VIVO*

La terapia delle polmoniti nosocomiali deve essere attentamente monitorata. A tal proposito si rende necessario valutare, oltre al dosaggio della concentrazione sierica delle singole molecole, possibile con metodi automatizzati per i glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina), per gli aminoglucosidi (gentamicina ed amikacina), per gli azoli (itraconazolo, voriconazolo, posaconazolo, isavuconazolo) oltre che per amfotericina B e 5-fluorocitosina, anche i parametri farmacocinetici/farmacodinamici necessari per l'eradicazione microbica. In particolare, è necessario valutare 1. il rapporto "picco"/MIC (per gli aminoglucosidi); 2. il tempo superiore alla MIC nel tempo di somministrazione (per le molecole betalattamiche, linezolid e clindamicina); 3. *Area Under the total concentration-time Curve* (AUC: area sotto la curva) delle 24 ore/MIC (per macrolidi, chinoloni, glicopeptidi).
Si segnala che le attività di (TDM) svolte per tutti gli antimicrobici o per la maggior parte di loro non è, tuttavia, disponibile in molte realtà e che, nondimeno, deve essere garantita in corso di terapia per infezioni gravi.

E3. LA DIAGNOSI MICOLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE

La diagnosi di laboratorio è basata sull'esame micologico diretto (colorazione con *cotton blue* – lattofenolo; in alternativa: colorazione sec. Gram oppure con *Calcofluor White*) e, successivamente, su quello colturale finalizzato alla ricerca di miceti filamentosi (preferibilmente con incubazione a 35°C per 2 giorni in atmosfera arricchita con 5% di CO_2 e proseguita a 30°C per almeno altre 2 settimane). In caso di colture di materiale polmonare bioptico è possibile incrementare la significatività della coltura mimando *in vitro* le condizioni fisiologiche (35°C, 6% O_2 -10% CO_2). La coltura di miceti filamentosi dai materiali respiratori non indica se si tratta di una colonizzazione o di un'infezione: l'isolamento di un micete filamentoso comporta la necessità di analizzare prelievi multipli e seriati e deve essere interpretato secondo la patologia di base del paziente (neutropenia in paziente leucemico, trapianto eterologo di midollo osseo, stadio avanzato di COPD, bronchiectasie, ecc.).

È fondamentale ricorrere, in caso di sospetto diagnostico fondato, routinariamente alla diagnostica istopatologica (colorazione di Gomori-Grocott; in alternativa: PAS). È imperativo effettuare la diagnosi di genere del micete isolato in coltura, procedendo successivamente alla diagnosi di specie, anche avvalendosi della eventuale collaborazione di Centri di Referenza. Metodi non-colturali per la diagnosi di infezione fungina invasiva da miceti opportunisti attualmente in uso sono la determinazione dei livelli sierici di beta-glucano, la ricerca dell'antigene galattomannano per *Aspergillus* spp, o la rilevazione molecolare degli acidi nucleici fungini, anche se i metodi eseguiti con PCR risultano ancora oggi meno standardizzati.

Un primo *test* sierologico per la diagnosi di micosi polmonare, soprattutto indicato nel caso di pazienti sintomatici al fine di guidare terapie *diagnostic-driven*, è rappresentato

dalla ricerca dell'1,3-β-D-glucano, componente della parete di gran parte dei miceti. Il *test* risulta negativo nelle infezioni da *Mucorales*, nella maggior parte delle infezioni da *C. neoformans* ed in quelle da *Blastomyces dermatitidis* ed è, comunque, accreditato di un elevatissimo Valore Predittivo Negativo.

La diagnosi precoce di infezione da *Aspergillus* spp. prevede la ricerca dell'antigene galattomannano di *Aspergillus* spp. su siero e su BAL. Si consiglia di non eliminare, dopo la processazione, il campione, ma di conservarlo in sieroteca per poi esaminarlo contestualmente a quello prelevato serialmente, in quanto è la variazione del contenuto sierico dell'antigene galattomannano che assume significato clinico in termini di diagnosi di infezione invasiva. Per tale motivo deve essere preferita la refertazione quantitativa (in particolare del test eseguito su BAL), giacchè il valore di densità ottica è molto predittivo di malattia rispetto a colonizzazIone. Tuttavia, la sensibilità del metodo è variabile a seconda delle categorie di soggetti, essendo utile nei pazienti con malattie oncoematologiche maligne ed in quelli che sono stati sottoposti a trapianto di cellule ematopoietiche più che nei riceventi di trapianto d'organo solido.

La ricerca degli anticorpi anti-*Aspergillus* IgG mediante metodica ELISA, utilizzando proteine ricombinanti, potrebbe essere di qualche utilità in pazienti non neutropenici a rischio di aspergillosi invasiva come i trapiantati d'organo solido e pazienti immunocompromessi con forme semiinvasive di aspergillosi invasiva, nonché pazienti con *Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis* (ABPA) o aspergilloma. La presenza di anticorpi antigalattomannano interferisce con la ricerca dell'antigene galattomannano.
L'utilizzo di *test* molecolari è oggi proposto anche per la rilevazione di *Aspergillus* spp., di *P. jirovecii* e di Mucorales. Se per *P. jirovecii* i dati della letteratura scientifici sono ormai consolidati, ancora oggetto di verifica sono quelli per le infezioni da *Aspergilli* e da zigomiceti.

Le polmoniti da *Candida* sono molto rare e possono essere primarie (per aspirazione) o secondarie ad un'infezione invasiva (via ematogena). Nella pratica clinica quotidiana, la coltura per *Candida* ed altri lieviti trova usualmente giustificazione solo nell'ambito di programmi di valutazione della colonizzazione in determinati pazienti ricoverati in terapia intensiva come parte di una valutazione di rischio di infezione invasiva all'interno di uno *score*. L'invasione (per esempio del torrente ematico) è generalmente e globalmente più probabile se preceduta da una colonizzazione multifocale.
In caso di sospetto clinico di localizzazione respiratoria di *Cryptococcus neoformans*: è necessario procedere alla rilevazione dell'antigene criptococcico sierico (metodo di agglutinazione al latice), alle emocolture ed eventualmente all'esame istologico da biopsia polmonare.

La diagnosi di infezione da miceti dimorfi prevede l'esecuzione dell'esame micologico diretto e della coltura dei materiali respiratori effettuata procedendo ad incubazione prolungata (almeno 4 settimane) a temperatura ambiente ed a 35°C. È fondamentale ricorrere, in caso di sospetto diagnostico fondato, routinariamente alla diagnostica istopatologica (colorazioni di Gomori-Grocott). È imperativo effettuare emocolture (incubazione per 4 settimane). È opportuno effettuare la ricerca di anticorpi circolanti anti-*Histoplasma capsulatum* ed anti-*Coccidioides immitis* (metodica di doppia diffusione in *agar*). La ricerca dell'antigene urinario per *Histoplasma* supporta una diagnosi di probabile micosi endemica, insieme a criteri clinici e dell'ospite appropriati, però non può essere considerata evidenza sufficiente di istoplasmosi certa perchè gli antigeni di *Histoplasma* si trovano anche nelle urine e nel siero dei pazienti con coccidioidomicosi e

blastomicosi. Di grande prospettiva è la ricerca dei miceti dimorfi nel siero dei pazienti con localizzazone polmonare con la tecnologia dei micro*array* proteici.

La diagnosi di infezione da *P. jirovecii* prevede l'analisi delle secrezioni bronchiali (colorazione sec. Gomori Grocott, sec. Giemsa o – preferibilmente - con tecnica di immunofluorescenza). Studi recenti indicano la buona attendibilità dei *test* di PCR eseguiti su lavaggio broncoalveolare.

L'esecuzione di *test* di chemioantibioticosensibilità nei confronti di *Aspergillus* sembra indicata in pazienti selezionati con aspergillosi invasiva, nei pazienti con infezione cronica e con terapia prolungata con azoli per la comparsa di resistenze, che può essere crociata alle varie molecole. Recentemente EUCAST ha indicato i valori *breakpoint* dell'amfotericina B, itraconazolo e posaconazolo per le principali specie di *Aspergillus.* È opportuno che l'esecuzione di tali *test* sia effettuata da Centri di comprovata esperienza.

E' possibile fare riferimento al percorso diagnostico "Micosi profonde e sistemiche", reperibile nel sito AMCLI.

E4. LA DIAGNOSI PARASSITOLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE

Alcuni parassiti possono essere ritrovati in campioni respiratori quali espettorati o bronco-aspirati, bronco-lavaggi o spazzolature.
L'unico parassita per il quale è indicata la ricerca a scopo diagnostico in campioni respiratori è *Paragonimus* spp.
Tutti gli altri parassiti sono ritrovati in campioni respiratori per loro migrazione e la diagnosi deve essere posta secondo le indicazioni riportate nei relativi Percorsi diagnostici di diagnosi parassitologica reperibili sul sito AMCLI.
In particolare, all'esame microscopico diretto, *Ascaris lumbricoides* e ancilostomatidi possono essere presenti in forma larvale poiché durante il loro ciclo vitale devono migrare dal cuore al polmone. Le larve di *A. lumbricoides* maturano da L1 a L4 e sono frequentemente visibili in forma filariforme (L3). Le larve di ancilostomatidi penetrano attraverso la cute e raggiungono il circolo cuore-polmone già in stadio L3.
Strongyloides stercoralis può essere rilevato con esame diretto nella sua forma larvale filariforme (L3) in caso di iperinfezione in soggetti immunodepressi.
Paragominus spp. è presente nel polmone nella sua forma adulta e nei campioni respiratori possono essere ritrovate le uova, sia all'esame diretto che anche dopo colorazione alcol-acido resistente per micobatteri. Può infatti essere un reperto casuale durante la ricerca di tubercolosi.
In riferimento all'echinococcosi cistica, in caso di vomica di una cisti fertile, è possibile rilevare al microscopio ottico la sabbia idatidea con i caratteristici uncini e i protoscolici.

Tra i protozoi si possono ritrovare oocisti di *Cryptosporidium* spp. e trofozoiti o cisti di *E. histolytica*.
Cryptosporidium spp. si rileva in caso di disseminazione in pazienti immunodepressi e dopo colorazione idonea per coccidi: colorazione di Ziehl-Neelsen a caldo, colorazione di Z-N modificata a freddo, colorazione di Kinyoun e colorazione con Auramina o Auramina-Rhodamina.

Per la diagnosi di infezione da *E. histolytica* e da *Cryptosporidium* spp., di schistosomiasi e strongiloidiasi si rimanda al "Percorso diagnostico delle parassitosi intestinali". Per la diagnosi di malaria, di filariasi e di infezione da *Trypanosoma brucei gambiense/*

rhodesiense e da *T. cruzi* si rimanda al "Percorso diagnostico delle parassitosi ematiche" e per quella di cisticercosi, echinococcosi, paragonimiasi, sparganosi, cenurosi, toxocariasi e trichinellosi e toxoplasmosi, è possibile fare riferimento al "Percorso diagnostico delle Parassitosi con localizzazione a livello del Sistema Nervoso Centrale" I tre percorsi citati sono reperibili nel sito AMCLI.

E5. LA DIAGNOSI VIROLOGICA DI INFEZIONE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE

La diagnosi tempestiva di infezioni gravi dovute a virus respiratori è fondamentale per un adeguato processo clinico decisionale, per intraprendere una terapia antivirale precoce e per implementare appropriate misure di controllo dell'infezione (Metlay *et al*., 2019).
La diagnosi delle infezioni virali viene effettuata con modalità in parte diverse dalle tecniche microbiologiche classiche. Prima di iniziare a descriverle si elencano alcuni aspetti peculiari della diagnosi virologica:

1. le tecniche colturali sono poco diffuse in ambito diagnostico, essendo di fatto praticabili solo nei laboratori con più elevato livello di specializzazione ma essendo poco utilizzate nella normale pratica clinica;
2. in alcuni laboratori viene effettuata la rilevazione di antigeni dei più diffusi virus respiratori mediante tecniche di immunofluorescenza a partire direttamente dai campioni respiratori o dopo colture "rapide" su appropriate linee cellulari. Anche questa metodologia è comunque poco diffusa;
3. sono disponibili *test* antigenici rapidi (Influenza A e B, RSV, hAdV, SARS-CoV-2) ma la loro predittività, specie in periodi non epidemici, quando la prevalenza dell'infezione è bassa, può non essere elevata. Per questo non sono consigliabili;
4. vanno sempre più diffondendosi *test* molecolari in grado di rilevare ampi pannelli virali nei diversi campioni respiratori. Questi *test*, in genere non quantitativi, hanno consentito di incrementare notevolmente i dati sulla circolazione dei virus respiratori, rivelando anche una inaspettata presenza di co-infezioni. L'interpretazione dei risultati ottenuti deve comunque essere sempre eseguita alla luce del quadro clinico e degli eventuali altri dati di laboratorio. Inoltre, non è chiaro se questi virus abbiano un ruolo eziologico diretto o semplicemente siano in attiva replicazione su una base patologica preesistente;
5. in alcuni casi di infezioni polmonari virali il campione respiratorio non è il più adatto per la rilevazione dell'infezione. Si cita ad esempio la polmonite da Hantavirus, dove l'RNA virale raggiunge titoli più elevati nel sangue;
6. grazie soprattutto alle tecniche molecolari, sono stati recentemente scoperti molti nuovi virus potenzialmente patogeni per il sistema respiratorio. La loro reale importanza quali patogeni umani ed i quadri clinici correlati alla loro infezione sono tuttora oggetto di indagine.

I materiali respiratori finalizzati all'accertamento virologico devono essere prelevati entro tre giorni dall'esordio sintomatologico. La diagnosi etiologica di infezione delle basse vie respiratorie dovrebbe avvalersi dell'analisi di secreti profondi (BAL, aspirato tracheobronchiale protetto), non sempre attuabile in presenza di condizioni critiche del paziente con polmonite. In alternativa, la dimostrazione di agenti virali nelle secrezioni delle alte vie respiratorie (aspirato nasofaringeo o tampone nasale) in presenza di quadri radiologici suggestivi può essere utile per la diagnosi di infezioni virali delle basse vie.

La moderna diagnosi rapida delle infezioni virali è basata principalmente sull'identificazione di antigeni o acidi nucleici virali nei secreti respiratori, mentre

l'isolamento virale su colture cellulari e gli accertamenti sierologici sono oggi ristretti ad ambiti operativi di approfondimento diagnostico e/o di ricerca.
I *test* di amplificazione degli acidi nucleici (NAAT) - tra cui la reazione a catena della polimerasi (PCR) e la PCR a trascrizione inversa (RT-PCR) - ed i *test* di rilevamento dell'antigene (immunodosaggio enzimatico ed immunofluorescenza) nonché il sequenziamento genomico (sia in Sanger che in NGS) sono le tecniche più utilizzate per l'identificazione virale.

L'identificazione del genoma virale mediate *real-time* PCR o micro*array* rappresenta oggi la modalità principale per la diagnosi delle infezioni virali respiratorie. Tali metodiche sono rapide, estremamente sensibili e specifiche ed hanno l'ulteriore vantaggio di essere quantitative, caratteristica importante sia per il monitoraggio delle infezioni che per discriminare il ruolo patogenetico di un determinato virus in caso di infezioni multiple. Inoltre, a differenza delle tecniche di coltura virale e di sierologia, che sono lente, le tecniche di rilevazione molecolare e dell'antigene forniscono risultati rapidi per supportare i processi decisionali relativi alla gestione clinica. È importante sottolineare che sono oggi disponibili diverse piattaforme commerciali che analizzano con metodica *multiplex* pannelli di virus respiratori. Infatti, uno dei vantaggi delle metodiche *multiplex* - sia nella versione *real-time* PCR quantitativa sia *melting temperature analyses* - è quello di poter includere in una sola reazione molti *target* virali. Alcune di queste piattaforme possono dare risposte molto rapide (circa 1 ora) lavorando in *random access* su singola cartuccia o mediamente meno di 4 ore lavorando in *batch* su un numero più consistente di campioni. Recentemente, una revisione sistematica con metanalisi che ha esaminato l'accuratezza diagnostica di alcune PCR *multiplex* nel rilevare i virus respiratori ha analizzato 22 studi con 5.510 campioni di pazienti con LRTI (Huang *et al*., 2018). Gli autori hanno concluso che i *test* in *multiplex* analizzati avevano un'elevata accuratezza diagnostica nel rilevare il virus dell'influenza A/B, RSV e hMPV mentre per altri virus l'accuratezza era inferiore alle singole *real-time* PCR, senza però entrare nel dettaglio delle quantità di *target* presente. Lo svantaggio principale di queste metodiche è il costo, che risulta mediamente più elevato rispetto alle metodiche di identificazione diretta di antigeni virali.
La rilevazione di antigeni virali è per lo più condotta mediante anticorpi monoclonali specifici e tecniche di immunofluorescenza o immunocromatografia.

Durante la pandemia da SARS-CoV-2 sono stati introdotti nei Pronto Soccorso per aumentare la potenzialità diagnostica. Questo *test* rapido (definibile *point-of-care*, POCT) per il rilevamento dei virus respiratori ha avuto in impatto importante nella rapida identificazione di pazienti con infezione da SARS-CoV-2 ed ha sicuramente modificato la gestione clinica del paziente. Un approccio di questo tipo potrebbe consentire la riduzione dell'uso di antibiotici o l'inizio precoce della terapia antivirale con il contemporaneo isolamento del paziente, se necessario. Tali metodiche presentano una notevole rapidità di esecuzione, ma sono spesso gravate da scarsa sensibilità analitica e da un ridotto di numero di patogeni *target* che possono essere saggiati contemporaneamente. I risultati di uno studio controllato randomizzato che ha analizzato l'effetto dei POCT in *routine* in comparazione con gli *outcome* clinici negli adulti ricoverati con infezioni respiratorie acute non hanno mostrato una sostanziale riduzione dell'uso degli antibiotici. Tuttavia, i pazienti del gruppo POCT hanno ricevuto dosi singole o più brevi cicli di antibiotici rispetto a quelli del gruppo di controllo. Il POCT è stato inoltre associato a una riduzione della durata della degenza ospedaliera, a una migliore individuazione di infezione da virus influenzale A ed all'uso della terapia antivirale.

Al proposito, si rimanda alle Linee di indirizzo per l'implementazione e la gestione dei *point-of-care-testing* (POCT) nella diagnostica microbiologica e nei *test* di *screening*, reperibile sul sito AMCLI.

Alcune considerazioni aggiuntive possono essere fatte su tempistiche di diagnosi ed efficacia di diagnosi nei diversi materiali biologici. L'associazione tra diagnosi tardiva ed esiti peggiori è ben nota nella LTRI. Uno studio retrospettivo del 2019 che ha valutato la relazione tra tempo alla diagnosi di RSV ed esiti clinici in 379 pazienti (50% in reparto, 18% in terapia intensiva e 30% nel reparto di emergenza) ha rilevato che il 47% dei casi è stato diagnosticato entro 12 ore dal ricovero, il 31% tra 12 e 24 ore e il 22% dopo le 24 ore. È stata inoltre osservata un'associazione tra diagnosi tardiva, degenza ospedaliera più lunga e tassi più elevati di utilizzo di antibiotici. Risultati simili sono stati riportati per l'influenza A(H1N1) nello studio multicentrico condotto in Spagna da Álvarez-Lerma et al. (2016), in cui sono state riscontrate associazioni significative tra una diagnosi tardiva e tassi più elevati di ricovero in terapia intensiva, un rischio più elevato di complicazioni come l'insufficienza respiratoria e renale e un aumento della mortalità.

Il dibattito sull'efficacia diagnostica continua quando si considera l'identificazione di virus tra diversi tipi di campioni respiratori. Tuttavia, un recente studio osservazionale ha riportato una maggiore concordanza tra gli aspirati nasofaringei e i campioni polmonari per la diagnosi di infezione virale mediante il saggio multiplex PCR (Robert et al., 2018). È interessante notare che un recente studio ha rilevato che il 47% dei pazienti con CAP non rispondente aveva un'eziologia virale, determinata da uno studio dei campioni bronco-alveolari, con influenza e adenovirus come virus più frequentemente identificati (Zhang et al., 2020)

Tuttavia, anche approcciando la diagnostica virologica delle infezioni virali con le moderne metodiche molecolari, resta il problema della definizione di pannelli diagnostici completi che tengano conto della stagionalità dei diversi virus, della loro complessità genetica e della diversa distribuzione geografica e della loro prevalenza nelle diverse fasce d'età.

Al contrario, i costi sono considerevolmente abbassati e l'epidemiologia dei virus respiratori (ad esempio: SARS-CoV-2) è cambiata nel tempo, ed il numero dei soggetti immunocompromessi è in aumento. Queste variabili rendono necessario l'utilizzo dei pannelli anche in ospedali di primo livello, delegando la fase di tipizzazione ai laboratori di secondo livello o di riferimento regionali. L'elenco minimo di *target* dovrebbe essere:

- Virus influenzale di tipo A (H1 e H3) e B;
- Virus respiratorio sinciziale;
- Metapneumovirus umano;
- Adenovirus umani;
- Virus parainfluenzali di tipo 1-4;
- Rinovirus ed Enterovirus;
- Coronavirus umani (OC43, 229E, NL63, HKU1, SARS-CoV-2).

Solo in contesti clinici ben specifico, quali quelli caratterizzato da immunocompromissione (ad esempio: trapiantato o in chemioterapia), età estreme (ad esempio: neonato <60 gg) oppure ad esposizione in un contesto di focolaio (e.g. morbillo, rosolia, parotite) è opportuno aggiungere anche la ricerca di:

- Parechovirus umani;
- Virus erpetici (herpes simplex, varicella zoster, citomegalovirus, virus Epstein-Barr);

- Virus esantematici (virus del morbillo e della rosolia);
- Virus parotite;
- MERS-CoV.

Per quanto attiene agli accertamenti sierommunologici, l'indicazione è di procedere solo in caso di mancata risposta alla terapia e nelle forme gravi. In tutti i casi è auspicabile congelare il siero di fase acuta che deve essere testato con quello prelevato in fase convalescente. La diagnosi indiretta effettuata su siero con tecniche EIA o di fissazione del complemento non devono essere considerate ai fini dell'accertamento diagnostico in fase acuta in quanto gravate da scarsa sensibilità nel periodo iniziale della malattia.

A completamento della diagnosi virologica vanno menzionate le metodiche di tipizzazione molecolare mediante sequenziamento, particolarmente utili per la sorveglianza delle epidemie influenzali e per l'analisi della resistenza agli antivirali. La pandemia da SARS-CoV-2 ha allargato la numerosità dei laboratori in grado di effettuare sequenziamento massivo di nuova generazione (NGS). La caratterizzazione delle varianti circolanti di SARS-CoV-2 mediante metodica NGS è stato il primo passo verso una standardizzazione e diffusione di un approccio non solo di diagnosi ma anche di caratterizzazione genomica (di solito a carico di laboratori di secondo livello o di riferimento).

L'introduzione sul mercato di anticorpi monoclonali da usare in terapia o profilassi e la commercializzazione di nuovi vaccini renderà necessario il monitoraggio delle varianti virali per verificare la presenza sia di varianti resistenti sia con mutazioni che rendono inefficace l'azione dell'anticorpo monoclonale.

Come ultima nota da sviluppare nel prossimo futuro come approccio diagnostico di terzo livello nei centri di riferimento sono i protocolli di sequenziamento metagenomico di nuova generazione (mNGS). Dato che i *test* diagnostici *standard* (molecolari e non) possono anche fallire l'identificazione di nuovi patogeni, ne deriva la necessità di un *test* diagnostico con la capacità di catturare tutti i potenziali agenti patogeni in un unico esame, utilizzabile indistintamente su matrici di origine umana, animale o ambientale. Recentemente, è stato sviluppato un protocollo mNGS (al momento usato solo per ricerca) che consiste nel sequenziamento massivo e non selezionato di tutto il DNA/RNA in un dato campione clinico. Questa tecnologia è stata testata su diversi campioni clinici di pazienti sia umani che animali con sindromi infettive molto diverse tra loro (e.g. neurologiche, respiratorie, sistemiche) e sono stati identificati diversi nuovi patogeni o varianti di patogeni già noti. L'introduzione di questa metodica sarà utile nel prossimo futuro per analizzare campioni di pazienti con polmoniti accertate nei cui campioni delle basse vie non sia stato evidenziato nessun patogeno con le metodiche classiche.

E6. LA VALUTAZIONE MICROBIOLOGICA DELLA COLONIZZAZIONE DELLE VIE RESPIRATORIE

La colonizzazione tracheale è comune nei soggetti intubati: in assenza di segni clinici essa non è segno di infezione e non è meritevole di considerazione. La VAT (tracheobronchite associata a ventilatore), potrebbe essere considerata invece il processo intermedio che da una colonizzazione anche con germi patogeni potrebbe evolvere in VAP. Il monitoraggio di *routine* dell'aspirato tracheale per anticipare l'eziologia di un possibile quadro di polmonite spesso può essere altamente confondente dal punto di vista della possibile evoluzione clinica del mero dato microbiologico soprattutto se non si tiene conto di questi aspetti fisiopatogenetici.

La valutazione microbiologica della colonizzazione delle vie respiratorie in pazienti intubati può essere presa in considerazione solo sulla base dei dati epidemiologici locali, ricorrendo a prelievi non protetti, effettuando prelievi per esame colturale in 7^ ed eventualmente in 14^ giornata di ricovero in reparto di Terapia Intensiva, procedendo comunque sempre, preferibilmente, a refertare i risultati in modo quantitativo. L'esecuzione di prelievi più ravvicinati può essere indicata in particolari contesti epidemiologici, quali quelli caratterizzati da elevata incidenza di MDRO, se non già nota.
In tutti i casi allo studio della colonizzazione deve essere attribuito un significato prettamente epidemiologico e non predittivo di malattia né può essere considerato un fattore primario per guidare l'approccio empirico, vieppiù oggi laddove siano disponibili risorse di microbiologia rapida.

E7. LA CEPPOTECA/SIEROTECA

È opportuno provvedere alla costituzione, in sede locale, di una ceppoteca dedicata, ove conservare gli stipiti microbici (batteri e miceti) identificati quali responsabili di polmonite nosocomiale, per eventuali successivi approfondimenti epidemiologici.

È inoltre, opportuno che il Laboratorio di Microbiologia provveda anche alla costituzione di una sieroteca per i sieri (di fase acuta e convalescente) dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Adair CG, Gorman SP, Feron BM et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 1999; 25: 1072-1076.
- Al-Tafiq JA, Kim H, Memish ZA. Parasiti lung diseases. *Eur Respir Rev* 2022; 31: 220093
- Álvarez-Lerma F, Marín-Corral J, Vila C. et al; H1N1 GETGAG/SEMICYUC Study Group. Delay in diagnosis of influenza A (H1N1)pdm09 virus infection in critically ill patients and impact on clinical outcome. *Crit Care* 2016; 20 (01) 337.
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Parassiti (Protozoi ed elminti) con localizzazione a livello del Sistema" –rif 2023-04. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Infezioni del torrente circolatorio" – rif 2023-13. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Micosi profonde e sistemiche" – rif 2023-16. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Micobatteriosi" – rif 2023-17, rev.2023. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Tubercolosi" – rif 2023-18, rev.2023. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Linee di indirizzo per l'implementazione e la gestione dei *point-of-care-testing* (POCT) nella diagnostica microbiologica e nei *test* di *screening*. *https://www.amcli.it/documenti/linee-di-indirizzo/*
- Ashkenazi-Hoffnung l, Oved K, Navon R et al. A host-protein signature is superior to other biomarkers for differentiating between bacterial and viral disease in patients with respiratory infection and fever without source: a prospective observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37: 1361-1371.
- Azoulay E, Timsit JL, Tafflet M et al. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent *Pseudomonas* ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2006; 129: 110-7.
- Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA et al. Community-Acquired Pneumonia in adults: guidelines for management. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 811-828.
- van Boheemen S, van Rijn AL, Pappas N et al. Retrospective validation of a metagenomic sequencing protocol for combined detection of RNA and DNA viruses using respiratory samples from pediatric patients. *J Mol Diagn* 2020; 22: 196-207.
- Boyer A, Goret J, Clouzeau B. Tailoring empirical antimicrobial therapy in subjects with ventilator-associated pneumonia with a 10-hour E-test approach. *Respir Care* 2019; 64: 307-312.

- Bouza E, Guinea J, Peláez T et al. Workload due to *Aspergillus fumigatus* and significance of the organism in the microbiology laboratory of a general hospital. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2075-2079.
- Bouza E, Torres MV, Radice C et al. Direct E-test (AB Biodisk) of respiratory samples improves antimicrobial use in ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 382-387.
- Brendish NJ, Malachira AK, Armstrong L. et al. Routine molecular point-of-care testing for respiratory viruses in adults presenting to hospital with acute respiratory illness (ResPOC): a pragmatic, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2017; 5 (05) 401-411.
- Carbo EC, Budding EP, Karelioti E et al. Improved diagnosis of viral encephalitis in adult and pediatric hematological patients using viral metagenomics. *J Clin Virol* 2020;130: 104566.
- Carbo EC, Blankespoor I, Goeman JJ et al. Viral metagenomic sequencing in the diagnosis of meningoencephalitis: a review of technical advances and diagnostic yield. *Expert Rev Mol Diagn* 2021; 21: 1139-1146.
- Casetta A, Doyon F, Antoun S et al. Diagnosis of nosocomial pneumonia in cancer patients undergoing mechanical ventilation: a prospective comparison of the plugged telescoping catheter with the protected specimen brush. *Chest* 1999; 115: 1641-1645.
- Centers for Disease Control and Prevention/National Healthcare Safety Network. CDC/NHSN Protocols Clarifications. July 2013
- Centers for Disease Control and Prevention. DPDx-Laboratory identification of parasites of Public Health concern. https://www.cdc.gov/dpdx/ parasite a z/index.html
- Charlton CL, Babady E, Ginocchio CC et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: viruses causing acute respiratory tract infections. *Clin Microbiol Rev*; 2018; 32: e00032-18.
- Chastre J, Luyt CE, Combes A et al. Use of quantitative cultures and reduced duration of antibiotic regimen for ventilator-associated pneumonia to decrease resistance in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (S2): S75-S81.
- Couturier MR, Bard JD. Direct-fro-specimen pathogen identification: evolution of syndromic panels. *Clin Lab Med 2019* ; 39 : 433-451.
- De Freitas Caires N, Legendre B, Parmentier E et al. Identification of a 14 kDa endocan fragment generated by cathepsin G, a novel circulating biomarker in patients with sepsis. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 5: 78-79.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, valid from 2023-01-01.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 6.1, valid from 2023-01-01.
- Falsey AR, Walsh EE. Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 518-524.
- Farina C. Arosio M, Vailati F et al. *Urinary detection of Streptococcus pneumoniae* antigen for diagnosis of pneumonia. *New Microbiol* 2002;25: 259-263.
- Galetto-Lacour A, Alcoba G, Posfay-Barbe KM et al. Elevated inflammatory markers combined with positive pneumococcal urinary antigen are good predictor of pneumococcal Community Acquired Pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis* J 2013 May 20 [Epub ahead of print].
- Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med* 2004; 350: 451-8.
- Guo Y-L, Chen Y-Q, Wang K, Qin S-M, Wu C, Kong J-lL. Accuracy of BAL Galactomannan in Diagnosing Invasive Aspergillosis. A Bivariate Metaanalysis and Systematic Review. *Chest* 2010; 13; 817–824.
- Hayon J, Figliolini C, Combes A, et al. Role of serial routine microbiologic culture results in the initial management of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165: 41-6.
- Heyland DK, Cook DJ, Dodek PM. Prevention of ventilator-associated pneumonia: current practice in Canadian intensive care units. *J Crit Car*e 2002; 17: 161-7.
- Heyland DK, Cook DJ, Marshall J et al. The clinical utility of invasive diagnostic techniques in the setting of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1999, 115: 1076-84.
- van Houten CB, de Groot JAH, Klein A et al. A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (OPPORTUNITY): a double-blind, multicentre, validation study. *Lancet Infect Dis* 2016
- Huang H-S, Tsai C-L, Chang J, Hsu T-C, Lin S, Lee C-C. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24 (10) 1055-1063.
- Isenberg H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology, Washington DC, 2004.

- Lee N, Walsh EE, Sander I. et al. Delayed diagnosis of respiratory syncytial virus infections in hospitalized adults: individual patient data, record review analysis and physician survey in the United States. *J Infect Dis* 2019; 220: 969-979.
- Lewandowska DW, Schreiber PW, Schuurmans MM et al. Metagenomic sequencing complements routine diagnostics in identifying viral pathogens in lung transplant recipients with unknown etiology of respiratory infection. *PLoS One* 2017; 12: e0177340.
- Lorusso A, Teodori L, Leone A et al. A new member of the Pteropine Orthoreovirus species isolated from fruit bats imported in Italy. *Infect Genet Evol* 2015; 30:5 5-58.
- Janssens JP, Krause KH. Pneumonia in the very old. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 112-24.
- Jerome A, Taylor C, Sreenu VB et al. Metagenomic next-generation sequencing aids the diagnosis of viral infections in febrile returning travellers. *J Infect* 2019; 79: 383-388.
- Kalmovich B, Rahamim-Cohen D, Ben David SS. Impact on patient management of a novel host response test for distinguishing bacterial and viral infections: real world evidence from urgent care setting. *Biomedicines* 2023; 11: 1498
- Kim P, Deshpande A, Rothberg MB. Urinary antigen testing for respiratory infections: current perspectives on utility and limitations. *Infect Drug Resist* 2022; 15: 2219-2228.
- Klech H, Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989; 2: 561-585.
- Klompas M, Kleinman K, Platt R. Development of an algorithm for surveillance of Ventilator-Associated Pneumonia with electronic data and comparison of algorithm results with clinician diagnoses. *Infect Control Hosp Epidem* 2008; 29.
- Koenig SM, Truwit JD. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2006: 19: 637-57.
- H Kunst, D Mack, O M Kon et al. Parasitic infections of the lung: a guide for the respiratory physician. *Thorax* 2011; 66:528-536.
- Kufner V, Plate A, Schmutz S et al. Two years of viral metagenomics in a Tertiary Diagnostic Unit: evaluation of the first 105 cases. *Genes (Basel)* 2019; 10: 661.
- Mandelia Y, Porocop GW, Richter AA et al. Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: the role of diagnostic and antimicrobial stewardship. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e01203-19.
- Markussen DL, Ebbesen M, Serigstad S et al. The diagnostic utility of microscopic quality assessment of sputum samples in the era of rapid syndromic PCR testing. *Microbiol Spectr* 2023; 11: e0300223.
- Mehta et al. (eds.), Diseases of the Central Airways, Respiratory Medicine, 2016, DOI 10.1007/978-3-319-29830-6_11.
- Metlay JP, Waterer GW, Long AC. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An official clinical practice guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. Am J Respir Crit Care Med 2019; 200: e45-e67.
- Muller B, Harbarth S, Stolz D et al. Diagnostic and prognostic accuracy of clinical and laboratory parameters in community-acquired pneumonia. *BMC Infectious Diseases* 2007, 7: 10 doi:10.1186/1471-2334-7-10.
- Murdoch DR, Laing RT, Mill GD et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001; 39:3495-3498.
- Navarro D, Garcia-Maset L, Gimeno C et al. Performance of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay for diagnosis of pneumonia in children with underlying pulmonary diseases in the absence of acute pneumococcal infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4853-4855.
- Oved K, Cohen A, Boico O et al. A novel host-proteome signature for distinguishing between acute bacterial and viral infections. 2015. *PLoS ONE* 10: e0120012.
- Rello J, Esandi M-E, Diaz E et al. The role of *Candida* sp isolated from bronchoscopic samples in nonneutropenic patients. *Chest* 1998; 114: 146-69.
- Rello J, Ollendorf DA, Oster G et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 2002; 122: 2121.
- Robert S, Lhommet C, Le Brun C. et al. Diagnostic performance of multiplex PCR on pulmonary samples versus nasopharyngeal aspirates in community-acquired severe lower respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2018; 108: 1-5
- Rogers BB, Shankar P, Jerris RC. et al. Impact of a rapid respiratory panel test on patient outcomes. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139: 636-641.
- Sakata KK, Azadeh N, Brigton A et al. Impact of nasopopharingeal FilmArray respiratory panel results on antimicrobial decisions in hospitalized patients. *Can Respir J* 2018; 2018: 9821426.

- Shah P, Giudice J, Griesback R Jr et al. The newer guidelines for the management of Community-Acquired Pneumonia. *JAOA* 2004; 104.
- Smith PR. What diagnostic tests are needed for community-acquired pneumonia? *Med Clinics North Am* 2001; 85: 1381-96.
- SteinM, Lipman-Arens S, Oved K et al. A novel host-protein assay outperforms routine parameters for distinguishing between bacterial and viral lower respiratory tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; 90: 206-213.
- Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir J* 2016; 48: 1764-1778.
- Vanhems P, Bénet T, Munier-Marion E. Nosocomial influenza: encouraging insights and future challenges. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29: 366-72.
- van Vugt SF, Broekhuizen BD, Lammens C et al. Use of serum C reactive protein and procalcitonin concentrations in addition to symptoms and sign s to predict pneumonia in patients presenting to primary care with acute cough: diagnostic study. *BMJ* 2013: 346: f2450.
- Wabe N, Li L, Lindeman R. et al. The impact of rapid molecular diagnostic testing for respiratory viruses on outcomes for emergency department patients. *Med J Aust* 2019; 210 (07) 316-320.
- Zaidi AKM, Reller B. Rejection criteria for endotracheal aspirate from pediatric patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 352-354.
- Zhang H, Han Y, Jin Z. et al. Detection of viruses by multiplex real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with nonresponding community-acquired pneumonia. *Can Respir J* 2020; 2020: 8715756

F. CONCLUSIONI

In conclusione, è possibile sintetizzare nei punti seguenti le caratteristiche fondamentali dell'approccio microbiologico alla diagnosi di polmonite:

1. quando possibile la diagnostica microbiologica dovrebbe precedere l'inizio della terapia antimicrobica. Questo non è sempre possibile per i campioni di secrezioni respiratorie ma verosimilmente lo è, nella maggior parte dei casi, per le emocolture;
2. la diagnostica microbiologica è indicata quando si sospetta la presenza di patogeni che potrebbero modificare in modo significativo oppure vanificare gli schemi di terapia empirica (evidenza A2);
3. in caso di CAP e di HAP non complicate la diagnosi di polmonite si basa sui dati clinici e radiologici con rischio relativamente contenuto di errore diagnostico (evidenza: B1): l'esecuzione routinaria di indagini per la rilevazione dei marcatori di infiammazione non è raccomandata (evidenza A1);
4. generalmente le colture di materiali respiratori e la colorazione di Gram possono essere utili quando la patologia è a maggiore gravità, presentandosi con quadri radiologici severi o con versamento pleurico e richiedendo l'ospedalizzazione oppure nei casi in cui si sospetti un'infezione da microrganismi resistenti o da patogeni poco comuni (ad esempio, in caso di anamnesi positiva per soggiorni in aree endemiche per miceti dimorfi o in circostanze note di epidemia) (evidenza B2). La presenza all'esame microscopico di morfotipi microbici predominanti è predittivo della successiva identificazione microbica in coltura (evidenza A3);
5. nelle forme di CAP non complicate non vi è in genere indicazione a praticare indagini microbiologiche, fatta eccezione che per le emocolture (positive nel 10% circa delle forme di CAP). La loro esecuzione è mandatoria in tutti i casi di pazienti con CAP grave che richiedono il ricovero in ospedale, in ragione di due-tre *set* (evidenza A2);
6. in caso di insuccesso terapeutico, da malattia severa e da infiltrati polmonari ben localizzati, e se l'anamnesi individuale (malattie linfoproliferative o neoplastiche, terapie chemio- o radioterapiche, immunodepressione patologica o iatrogena)

oppure i dati epidemiologici locali fanno sospettare la presenza di patogeni quali *P. jirovecii* o *S. pneumoniae* penicillino-resistente, è opportuno un attento studio topografico dell'*imaging* toracico con successivo prelievo di materiali respiratori distali raccolti con tecniche protette per gli opportuni accertamenti microbiologici;

7. vi è indicazione ad eseguire la ricerca degli antigeni urinari di *S. pneumoniae* e di *L. pneumophila* per motivi clinici (il primo) e clinico-epidemiologici (il secondo) (evidenza: A3). L'eventuale negatività del *test* urinario per la rilevazione antigenica di *L. pneumophila* ser 1 non esclude tuttavia un'infezione da *Legionella* spp. (evidenza A3);
8. non vi è indicazione ad effettuare di *routine* la ricerca sierologica di anticorpi anti *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e *L. pneumophila* (evidenza: A3), il cui valore è più per valutazioni epidemiologiche che cliniche;
9. in caso di insuccesso terapeutico, è necessario procedere alla ricerca con *test* molecolari quantitativi di *S. pneumoniae* (materiali respiratori, sangue) e dei virus dell'Influenza e dei RSV nelle stagioni fredde e degli altri agenti virali in caso di gravità clinica accertata (evidenza A3);
10. le colture possono essere effettuate, con diversi gradi di sensibilità e specificità, su aspirato tracheale o su campioni da polmone profondo ottenuti sotto guida broncoscopica o meno:
    a. la scelta del metodo dipende dall'esperienza in sede locale, dalla disponibilità organizzativa e dai costi che ciascuna struttura può affrontare. Il BAL deve essere comunque preferito in caso di polmonite refrattaria alle terapie (evidenza: A3). Il prelievo che prevede l'uso del broncoscopio deve essere riservato ai soggetti intubati e, comunque, a casi selezionati di pazienti non-intubati sulla base delle condizioni respiratorie individuali (evidenza: A3);
    b. se per un prelievo di secrezioni distali non è possibile usare una tecnica broncoscopica, è possibile ricorrere ad una modalità di prelievo "*blind*", purché la tecnica microbiologica utilizzata sia quantitativa, al fine di avere una corretta possibilità di impostazione terapeutica;
    c. ogni materiale respiratorio si caratterizza per suoi valori-soglia (UFC/mL) ed i suoi limiti metodologici;
    d. le tecniche che identificano i patogeni su base qualitativa determinano un maggior numero di trattamenti (clinicamente inutili); le tecniche che identificano i patogeni su base semiquantitativa sono meno affidabili nel definire la presenza di polmonite e la necessità di una terapia: entrambi gli approcci, quindi, devono essere fortemente scoraggiati. Al contrario, il ricorso a colture quantitative di materiali respiratori distali raccolti con metodi protetti consente di estrapolare, da eventuali popolazioni polimicrobiche, i microrganismi responsabili del quadro clinico su cui procedere all'identificazione e ai *test* di sensibilità (evidenza B3). Tuttavia, comporta tempi di risposta non immediati e, pertanto, implica la necessità di eseguire *test* ancillari (Giemsa, Gram) per la definizione della cellularità e dei morfotipi microbici e per la rilevazione di batteri intracellulari;
    e. la coltura dei materiali respiratori distali prelevati con metodica invasiva comporta un'interpretazione "prudente" e cumulativa con le circostanze cliniche per valori quantitativi *borderline* (± 1 Log dal *cut off*);
    f. la variabilità dei risultati quantitativi, per la distribuzione irregolare degli organismi nelle secrezioni e per la esiguità del volume campionato, deve sempre essere tenuta presente in sede di valutazione clinica del risultato microbiologico;

11. nel paziente sottoposto a ventilazione meccanica:
    a. se sussiste sospetto di VAP è necessario considerare la necessità di ricorrere a metodi invasivi in corso di broncoscopia per assicurare una sicura diagnosi differenziale (patologia non infettiva, infezione extrapolmonare, ecc), poiché i segni clinici e radiologici spesso non sono altamente specifici per una infezione polmonare;
    b. se sussiste sospetto di ARDS è opportuno eseguire un BAL piuttosto che un PSB: esso permette non solo di definire l'eziologia ma anche di valutare l'entità del danno alveolare diffuso;
12. in caso di presenza di versamento pleurico, è opportuno eseguire anche una toracentesi:
    a. essa deve essere valutata caso per caso e comunque solo se la gravità clinica permane a fronte dell'inconclusività diagnostica di prelievi meno invasivi per l'esecuzione di indagini colturali (evidenza A3);
    b. In caso di effusione parapneumonica è opportuno procedere alla rilevazione dell'antigene di *S. pneumoniae* utilizzando il metodo validato per le urine (evidenza A3);
13. il ricorso a *test* molecolari (pannelli sindromici) è indicato soprattutto in caso di CAP grave, di VAP all'esordio e, comunque, in presenza di condizioni con andamento rapidamente evolutivo. È necessaria, d'altra parte, l'esecuzione di *test* sindromici molecolari il cui spettro identificativo sia coerente con i dati clinico-epidemiologici specifici. Il ricorso a questa tipologia di *test* dovrebbe essere orientativamente limitato all'accertamento di microrganismi – batteri, miceti e virus (influenza, RSV, SARS CoV-2) per i quali sono disponibili terapie mirate. La scelta dei microrganismi inclusi nel pannello – e dei microrganismi da sottoporre a refertazione selettiva a giudizio dello specialista microbiologo – consegue alla conoscenza dei dati anamnestici (AEBX, AECOPD, CAP, HAP, sCAP, VAC, VAP, VAT) e clinici. Il ricorso a tale *test* deve essere effettuato esclusivamente al momento del sospetto clinico, e non deve essere ripetuto in seguito in caso di positività. Esso non è alternativo alla diagnostica microbiologica tradizionale, ma è a lei complementare: è necessario processare con le tecniche *standard* e con quelle molecolari il medesimo campione biologico prelevato per le indagini *standard* ed in accordo con le indicazioni del produttore:
    a. in caso di CAP ospedalizzata in reparto di Terapia Intensiva: *Chlamydophila pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* (se paziente di età neonatale o pediatrica se il quadro clinico è suggestivo: *Bordetella parapertussis* e *B. pertussis*), Influenza A e B, RSV, SARS-CoV-2;
    b. in caso di NHAP ospedalizzata in reparto di Terapia Intensiva: *Chlamydophila pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, Influenza A e B, RSV, SARS-CoV-2;
    c. in caso di VAP: *Acinetobacter baumannii* complex, Enterobacterales (*Enterobacter cloacae* complex, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae complex*, *Proteus* spp., *Serratia marcescens*), *Hemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pyogenes* e *S. agalactiae*) ed i geni di resistenza per ESBL (CTX-M), carbapenemasi (IMP, KPC, NDM, Oxa48-like, VIM) e meticillino-resistenza (mecA e mecC);

d. in caso di polmonite in soggetti immunocompromessi sottoposti a trapianto d'organo solido o di midollo, affetti da patologie oncoematologiche maligne o di età estreme (<60 giorni; >80 anni): tutti i microrganismi indicati in caso di CAP grave e di VAP, inclusi i miceti filamentosi. Inoltre: Adenovirus umani, Bocavirus, Coronavirus umani (OC43, 229E, NL63, HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV-2), Metapneumovirus umano, Parechovirus umani, Rinovirus ed Enterovirus, Virus influenzale di tipo A (H1 e H3) e B, Virus parainfluenzali di tipo 1-4, Virus respiratorio sinciziale, Virus erpetici (herpes simplex, varicella zoster, citomegalovirus, virus Epstein-Barr), Virus esantematici (virus del morbillo e della rosolia), Virus parotite;
e. in caso di BPCO riacutizzata e/o in trattamento cronico con steroidi per via inalatoria è opportuno procedere ad attenta valutazione microbiologica con metodo tradizionale (evidenza: C3) e – in caso di ricovero ospedaliero – con metodo molecolare per la rilevazione dei microrganismi descritti in caso di CAP e di VAP;
f. nel paziente con bronchiectasie è opportuno valutare il monitoraggio periodico della condizione di colonizzazione batterica e/o fungina (evidenza: B3);
g. in caso di esposizione in un contesto di focolaio epidemico: Virus esantematici (virus del morbillo e della rosolia), Virus parotite;
h. in caso di soggetto sottoposto ad ECMO: tutti i microrganismi indicati in caso di CAP grave, di VAP, di immunocompromissione e di focolaio epidemico.

14. ripetere, in caso di VAP, il prelievo per le colture batteriche o fungine dopo 72 ore dall'inizio della terapia antibiotica per verificare l'efficacia del trattamento e rilevare eventuali resistenze antibiotiche. Si ricorda di non ricorrere mai a *test* molecolari in corso di terapia.
15. l'opportunità - da valutare in sede locale sulla base dei dati epidemiologici della singola realtà - di monitorare la condizione di colonizzazione dei soggetti intubati comporta l'esecuzione di colture di sorveglianza dei tubi endotracheali utilizzando materiali respiratori non protetti sulla base di un calendario operativo predefinito. Si consiglia di effettuare un prelievo per esame colturale in 7^ ed eventualmente in 14^ giornata di ricovero in reparto di Terapia Intensiva al fine di verificare l'avvenuta colonizzazione endotracheale da parte dei microrganismi, in particolare quelli multiresistenti, causa di VAP secondo il classico gradiente temporale;
16. i referti devono riportare in modo cumulativo ed evidente i risultati effettuati sullo stesso campione biologico: esame microscopico diretto e Q *score*, esame colturale, esame molecolare diretto (identificazione e determinanti di resistenza), *test* di antibioticosensibilità. Si consiglia di procedere a refertazioni "parziali" man mano che i risultati sono disponibili. Sulla base delle possibilità dei diversi sistemi informativi di laboratorio (LIS) si consiglia di riportare per primi i risultati colturali dei campioni prelevati da sedi polmonari distali con metodo di prelievo protetto ed a questi fare seguire gli altri. I referti, inoltre, devono essere sempre commentati, apponendo note esplicative del *test* utilizzato ed interpretative dei risultati;
17. é opportuno che, in sede locale, siano periodicamente verificati gli indicatori per la corretta gestione delle polmoniti L'allegato 4 riporta, a titolo d'esempio, alcuni possibili indicatori riguardanti la gestione della diagnostica eziologica di polmonite. Essi possono, eventualmente, essere contestualizzati ed adattati alle singole realtà, d'intesa con il CIO locale.

Per quanto attiene alla parte specifica dei laboratori di Microbiologia e Virologia Clinica possono essere opportunamente monitorati, possibilmente a cadenza mensile:

- il tempo di refertazione dei campioni prelevati da sede distale con tecnica protetta
  - esame eseguito con tecnologia biomolecolare → 90% entro 8 ore;
  - esame microscopico diretto → 90% entro 12 ore;
  - identificazione microbica (coltura monomicrobica) → 90% entro 48 ore;
  - *test* di sensibilità (MIC) → 90% entro 48 ore.

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Bard DB, McElvania E. Panels and syndromic testing in Clinical Microbiology. *Clin Lab Med* 2020; 40: 393-420.
- Mehta RM, Niederman MS. Nosocomial pneumonia in the intensive care unit: controversies and dilemmas. *J Intens Care Med* 2003; 18: 175-88.
- Waterer GW, Wunderink RG. Controversies in the diagnosis of ventilator-acquired pneumonia. *Med Clin North Am* 2001; 85: 1565-81.
- Woodhead M, Blasi F, Ewig S et al. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. Full version. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 (S1): E1-E59
- Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, Gonzalez MD, Jerris RC, Kehl SC, Patel R, Pritt BS, Richter SS, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Snyder JW, Telford S 3rd, Theel ES, Thomson RB Jr, Weinstein MP, Yao JD. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018 Aug 31;67(6): e1-e94. doi: 10.1093/cid/ciy381. PMID: 29955859; PMCID: PMC7108105.

G. *LINK* A PERCORSI DIAGNOSTICI AMCLI

- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Parassiti (Protozoi ed elminti) con localizzazione a livello del Sistema" –rif 2023-04. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Infezioni del torrente circolatorio" – rif 2023-13. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Micosi profonde e sistemiche" – rif 2023-16, rev.2023. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Micobatteriosi" – rif 2023-17, https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Tubercolosi" – rif 2023-18. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/
- AMCLI ETS. Linee di indirizzo per l'implementazione e la gestione dei point-of-care-testing (POCT) nella diagnostica microbiologica e nei test di screening. https://www.amcli.it/documenti/linee-di-indirizzo/

Allegato 1

PRELIEVO ED INVIO DEI MATERIALI RESPIRATORI AL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA CLINICA

1. Norme generali

Le indicazioni, che di seguito si riportano, sono proposte in chiave elettivamente finalizzata a garantire la migliore qualità della matrice biologica che deve essere processata in laboratorio.

Non si fa, quindi, riferimento - nel dettaglio - agli aspetti più strettamente organizzativi che devono essere contestualizzati localmente. Essi sono relativi, ad esempio, alla presenza di uno o più operatori – medico, infermiere, operatore sociosanitario; disponibilità dei dispositivi di protezione individuale; rispetto dei cinque momenti dell'igiene delle mani proposti da WHO; manipolazione dei presidi disponibili.

Da queste note possono essere tratte – ed opportunamente adattate alle singole realtà - le indicazioni da trasmettere al paziente qualora debba procedere alla raccolta dei campioni biologici in regime ambulatoriale.

In tutti i casi è comunque necessario:

- istruire il paziente circa le modalità di prelievo, assicurandosi che le indicazioni fornite siano comprese. In caso di prelievo con modalità protetta provvedere anche alla raccolta dell'adesione formale del paziente;
- raccogliere i campioni preferibilmente prima dell'inizio della terapia chemio-antibiotica; in ogni caso, segnalare al Laboratorio di Microbiologia l'eventuale a terapia antibiotica in atto;
- non raccogliere in modo cumulativo i materiali respiratori per tutto il corso delle 24 ore;
- non raccogliere campioni ad intervalli di tempo inferiori a 48 ore;
- indossare guanti sterili su entrambe le mani;
- utilizzare, per la raccolta, una provetta o un contenitore a bocca larga e tappo a vite, sterili;
- contrassegnare i campioni riportando correttamente i dati identificativi del paziente e la data e l'ora di esecuzione del prelievo;
- compilare accuratamente il modulo di richiesta;
- inviare tempestivamente il materiale al Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica, possibilmente entro 15 minuti dalla raccolta, conservandolo a temperatura ambiente. I campioni che pervengono al Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica in un tempo prevedibilmente superiore devono essere conservati a +4°C: in ogni caso i campioni che pervengono al laboratorio dopo più di 2 ore non dovrebbero essere esaminati per la possibilità di risultati "falsi negativi" – è il caso di *S. pneumoniae* particolarmente labile - o "falsi positivi" – per sovracrescita della popolazione microbica residente.

2 Modalità di prelievo

2.1. Espettorato

possibilità diagnostiche:

- questo campione può essere ottenuto da pazienti che siano in grado di espettorare. La produzione di escreato dalle basse vie aeree non è caratteristica costante dei pazienti immunocompromessi, in particolare di quelli neutropenici;
- effettuare la raccolta sotto la supervisione di personale addestrato (infermiere o fisioterapista);
- invitare a non usare dentifricio ed a non fare gargarismi con acqua del lavandino;
- evitare l'introduzione di materiale salivare o di secrezioni nasali nel contenitore per la raccolta. In caso contrario, ripetere la procedura dall'inizio;
- è possibile effettuare la ricerca dei batteri, micobatteri e miceti filamentosi e dimorfi.

prelievo:

1. rimuovere eventuali protesi dentarie;
2. grattare gentilmente, con spazzolino da denti o con tampone umidi, la mucosa interna delle guance, le gengive e la lingua;
3. sciacquare il cavo orale con acqua (o con soluzione fisiologica) sterile;
4. espettorare (con un colpo di tosse) in un contenitore a bocca larga sterile e con tappo a vite.

2.2. Espettorato indotto

possibilità diagnostiche:

- l'induzione dell'espettorazione consente di raccogliere il materiale da pazienti con tosse non produttiva. Inizialmente proposta per lo studio del polmone profondo in pazienti con asma BPCO in soggetti per i quali non era possibile ricorrere a tecniche di prelievo invasive, questa tecnica è stata poi indirizzata a soggetti non espettoranti con sospetto di tubercolosi polmonare o con opacità a lenta risoluzione e di difficile diagnosi differenziale. La sua esecuzione trova particolare indicazione nel caso di pazienti ipossici anche immunodepressi e con alta probabilità di polmonite per i quali è sconsigliata l'esecuzione di prelievi in fibrobroncoscopia;
- effettuare la raccolta sotto la supervisione di personale addestrato (infermiere o fisioterapista);
- evitare l'introduzione di materiale salivare o di secrezioni nasali nel contenitore per la raccolta. In caso contrario, ripetere la procedura dall'inizio.
- l'indaginosità operativa limita di molto l'utilizzo di questa modalità di raccolta nella *routine* clinica;
- è possibile effettuare la ricerca di micobatteri e di *P. jirovecii*. È possibile ricercare anche batteri, miceti filamentosi e dimorfi.

prelievo:

1. rimuovere eventuali protesi dentarie;
2. grattare gentilmente, con spazzolino da denti o con tampone umidi, la mucosa interna delle guance, le gengive e la lingua il più a lungo possibile (almeno 5 minuti);
3. sciacquare il cavo orale con acqua (o con soluzione fisiologica) sterile;
4. sottoporre il paziente a manovre di fisioterapia respiratoria;

5. inalare, con l'ausilio di un nebulizzatore ultrasonico, da 20 a 30 mL di soluzione al 5% di NaCl.
6. espettorare (con un colpo di tosse) in un contenitore a bocca larga sterile e con tappo a vite.

2.3. Espettorato indotto protetto

possibilità diagnostiche:

- l'induzione dell'espettorazione consente di raccogliere il materiale da pazienti con tosse non produttiva. Al pari di quanto indicato per l'espettorato indotto, la sua esecuzione trova particolare indicazione nel caso di pazienti ipossici per i quali è sconsigliata l'esecuzione di prelievi in fibrobroncoscopia;
- effettuare la raccolta sotto la supervisione di personale addestrato (infermiere o fisioterapista);
- evitare l'introduzione di materiale salivare o di secrezioni nasali nel contenitore per la raccolta. In caso contrario, ripetere la procedura dall'inizio.
- l'indaginosità operativa limita di molto l'utilizzo di questa modalità di raccolta nella *routine* clinica è possibile effettuare la ricerca dei batteri, micobatteri e miceti filamentosi, dimorfi e di *P. jirovecii*.

prelievo:

1. rimuovere eventuali protesi dentarie;
2. grattare gentilmente, con spazzolino da denti o con tampone umidi, la mucosa interna delle guance, le gengive e la lingua;
3. sciacquare il cavo orale con acqua;
4. individuare sulla faccia interna delle guance i fori del dotto di Stenone e bloccarli con cilindretti di cotone sterile;
5. sottoporre il paziente a manovre di fisioterapia;
6. inalare, con l'ausilio di un nebulizzatore ultrasonico, da 20 a 30 mL di soluzione al 5% di NaCl.
7. espettorare (con un colpo di tosse) in un contenitore a bocca larga sterile e con tappo a vite.

2.4. Aspirato endotracheale/bronchiale

possibilità diagnostiche:

- questo materiale può essere raccolto in pazienti intubati oppure no, provvedendo all'aspirazione delle secrezioni che ristagnano in trachea: il suo prelievo deve essere limitato ai casi di presenza di segni clinici di polmonite (febbre ed infiltrati);
- il materiale è scarsamente idoneo per le ricerche microbiologiche, salvo che per quella di patogeni stretti come *Mycobacterium* spp. e *Legionella* spp. L'interpretazione dell'esame deve tenere conto del fatto che la trachea è colonizzata dopo 24 ore dal momento dell'inserzione del tubo e per molti giorni dopo che il tubo è stato tolto.

prelievo:

1. sfilare il sondino dalla confezione e connetterlo al sistema di aspirazione;
2. dopo adeguato monitoraggio multiparametrico, disconnettere il paziente dal respiratore evitando che il raccordo terminale si contamini (si può evitare di disconnettere il paziente dal respiratore utilizzando un tubo a due vie);

3. inserire delicatamente il sondino nel tubo endotracheale per una lunghezza pari a quella del tubo;
4. aspirare ad intermittenza il campione - ruotando il sondino per non più di 10 secondi - nell'apposito contenitore sterile raccordato al tubo endotracheale;
5. riconnettere il paziente al ventilatore o ventilarlo manualmente;

2.5. Aspirato da tracheostomia

possibilità diagnostiche:

- la raccolta del materiale consegue all'esecuzione di una tracheostomia in condizioni di asepsi, in sala operatoria (salvo che condizioni di urgenza richiedano un intervento di emergenza oppure al letto del paziente). Fino a quando la ferita da tracheostomia non è completamente cicatrizzata, è necessario impiegare tecniche "*no touch*".
- il materiale è scarsamente idoneo per le ricerche microbiologiche per i motivi che ne rendono difficile l'interpretazione per la quale si deve tenere conto del fatto che la trachea è colonizzata dopo 24 ore dall'inserzione del tubo ed i risultati microbiologici possono non correlare con la diagnosi eziologica;
- non processare più di un campione al mese in pazienti con fibrosi cistica non trapiantati ambulatoriali;
- on processare più di due campioni al mese per pazienti con fibrosi cistica non trapiantati ricoverati;
- non utilizzare i criteri di non conformità per l'espettorato o gli aspirati endotracheali basandosi sui criteri di qualità del Gram, che sono di poco valore nei pazienti con fibrosi cistica.

prelievo:

1. aspirare il campione nell'apposito contenitore sterile raccordato al tubo endotracheale.

2.6. Tampone rino-faringeo

possibilità diagnostiche:

- il ricorso a questa modalità di prelievo è indicata solo per la ricerca mirata di virus, *Bordetella pertussis* e di *Chlamydophila* spp. È conveniente utilizzare un tampone floccato flessibile, meno inibente per la vitalità di *B. pertussis*.

prelievo:

1. accertarsi che il capo del paziente sia immobilizzato;
2. inserire gentilmente il tampone in una narice, fino a raggiungere il retrofaringe;
3. lasciare *in situ* per pochi secondi;
4. strofinare la punta del tampone sulla mucosa della porzione medio-inferiore del turbinato inferiore
5. ruotare ripetutamente la punta del tampone sulla mucosa, raccogliendo materiale cellulare;
6. estrarre il tampone;
7. inserire il tampone nel terreno di trasporto;
8. tagliare il tampone come indicato dal fornitore;
9. trattare il tampone secondo le indicazioni del Laboratorio di Microbiologia Clinica;
10. le modalità di invio devono essere concordate con il laboratorio, sulla base di linee di indirizzo o PDTA locali.

2.7. Aspirato rino-faringeo

possibilità diagnostiche:

- il ricorso a questa modalità di prelievo è indicato solo per la ricerca mirata di virus, *Bordetella pertussis* e di *Chlamydophila* spp. È modalità accettata – in età pediatrica – anche per la valutazione della popolazione microbica dei soggetti affetti da Fibrosi Cistica.

prelievo:

1. accertarsi che il capo del paziente sia immobilizzato;
2. inserire gentilmente il sondino in una narice, fino a raggiungere il retrofaringe;
3. aspirare le secrezioni;
4. le modalità di raccolta (tipo di contenitore) ed invio devono essere concordate con il laboratorio.

2.8 Lavaggio bronchiale

possibilità diagnostiche:

- il lavaggio bronchiale eseguito con broncoscopio flessibile a fibre ottiche è tecnica relativamente innocua e può risultare utile solo quando non sia possibile la raccolta di materiali più significativi, soprattutto in soggetti immunocompromessi;
- l'anestesia per *aerosol* è metodica descritta "teoricamente" ma scarsamente praticata se non in corso di broncoscopia diagnostica. Nelle polmoniti in soggetti coscienti e collaboranti tale prelievo viene effettuato in corso di broncoscopia in anestesia locale solo quando non è possibile praticare il BAL o come metodica diagnostica di *routine* in corso di broncoscopia diagnostica;
- il materiale non è idoneo per indagini microbiologiche (fanno eccezione i patogeni stretti quali *M. tuberculosis*, *Legionella* spp., *P. jirovecii* e miceti filamentosi).

prelievo:

1. sottoporre il paziente ad anestesia superficiale per aerosol;
2. inserire il broncoscopio per via trans-nasale o per via trans-orale (pazienti non intubati) oppure attraverso il tubo endotracheale (pazienti intubati);
3. iniettare soluzione fisiologica (con NaCl 0,9%) in aliquote di 5-20 mL, per un quantitativo totale massimo di circa 100 mL, utilizzando una siringa applicata esternamente al broncoscopio;
4. rinviare le operazioni di *brushing* o le biopsie a quando la raccolta del materiale di lavaggio bronchiale sarà stata ultimata: un eccessivo sanguinamento nel liquido di recupero potrebbe modificare il rapporto tra le componenti cellulari e quelle non cellulari;
5. aspirare delicatamente la soluzione fisiologica direttamente in un contenitore sterile (provetta o contenitore a bocca larga e tappo a vite) prima di iniettare al paziente l'aliquota successiva. Mediamente viene recuperato circa il 50-75% del liquido iniettato. Raccogliere ogni aliquota in un contenitore dedicato;
6. registrare la quantità di soluzione fisiologica iniettata;
7. addizionare in un unico contenitore solo il materiale prelevato dallo stesso sito anatomico.

2.9. Lavaggio bronco-alveolare

possibilità diagnostiche:

- il lavaggio broncoalveolare eseguito con broncoscopio flessibile a fibre ottiche è tecnica relativamente innocua. Effetti collaterali di scarsa entità possono essere: tosse durante il lavaggio, febbre e brividi alcune ore dopo la manovra, infiltrazione alveolare transitoria 24 ore dopo il prelievo, transitorio deterioramento dei parametri di funzionalità respiratoria. La maggior parte degli effetti collaterali sono correlabili alla manovra endoscopica, alla sede ed all'estensione dell'area polmonare sottoposta a lavaggio nonché al volume ed alla temperatura del fluido instillato;
- la raccolta del campione deve essere effettuata con particolari cautele nei pazienti con anamnesi di asma bronchiale ed in quelli ipossici (PaO_2 <60 mm Hg): in questi soggetti la broncoscopia, se mandatoria, può essere praticata previa ventilazione in maschera e/o assistenza anestesiologica a seguito di un'attenta valutazione del rapporto rischio beneficio);
- problemi tecnici possono essere osservati nei soggetti affetti da bronchite cronica ostruttiva. I pazienti con severe patologie di base od in condizioni critiche possono richiedere la somministrazione di ossigeno, premedicazioni con beta-agonisti in aerosol ed il monitoraggio dell'elettrocardiogramma. Consigliabili sono la disponibilità di un saturimetro e di un accesso venoso;
- un campione di BAL non è microscopicamente differenziabile da un campione di lavaggio bronchiale: il primo però è materiale proveniente dai bronchioli distali e dagli alveoli, il secondo – analogamente a quanto si realizza con l'aspirato bronchiale - da vie aeree più craniali;
- oltre a consentire lo studio dei fenomeni infiammatori ed immunitari, è metodica indicata per le ricerche batteriologiche, fungine, parassitologiche e virologiche. Per l'esame microbiologico del materiale da lavaggio broncoalveolare sono necessari almeno 10 mL.

prelievo:

1. porre il paziente in posizione supina;
2. sottoporre il paziente ad anestesia e sedazione leggera, possibilmente evitando l'impiego di xylocaina. È consigliabile somministrare l'anestetico per *aerosol*. Tuttavia, nei pazienti intubati e con sospetta VAP: possibilmente evitare l'impiego di xilocaina);
3. aspirare delicatamente con un sondino da aspirazione le secrezioni presenti in orofaringe o nel tubo di ventilazione (se il paziente è ventilato) per eliminare la maggior parte delle secrezioni che rischierebbero di contaminare il prelievo;
4. inserire il broncoscopio per via trans-nasale o per via trans-orale nel caso di pazienti non intubati. Inserire il broncoscopio attraverso il tubo endotracheale nel caso di pazienti intubati e possibilmente procedere fino al punto di destinazione evitando di aspirare per evitare contaminazioni;
5. incuneare la punta del broncoscopio in un ramo sub-segmentale del lobo medio o della lingula oppure - in caso di opacità distrettuali di sospetta natura infettiva - di altre sedi, facendo avanzare il più possibile lo strumento durante un'inspirazione profonda;
6. iniettare soluzione salina sterile (NaCl 0,9%, pH 7.0) isotermica (35°C) per un quantitativo pari a circa 100-150 mL (quantitativo totale massimo di 200 mL) con

siringa applicata esternamente al broncoscopio. È opportuno somministrare in aliquote di 20 mL (almeno cinque) o di 50 mL (almeno tre);
7. rinviare le operazioni di *brushing* o le biopsie a quando la raccolta del materiale di lavaggio bronchiale sarà stata ultimata: un eccessivo sanguinamento nel liquido di recupero potrebbe modificare il rapporto tra le componenti cellulari e quelle non cellulari;
8. aspirare manualmente e delicatamente la soluzione fisiologica direttamente in un contenitore sterile prima di iniettare al paziente l'aliquota successiva. Mediamente viene recuperato circa il 50-75% (40-60% nei grandi fumatori) del liquido iniettato. Raccogliere ogni aliquota in un contenitore sterile dedicato;
9. registrare la quantità di soluzione fisiologica iniettata, l'eventuale presenza macroscopica di sangue, la sede del prelievo in relazione alla sede della lesione documentata radiologicamente;
10. non utilizzare per le indagini microbiologiche le prime aliquote ("frazione bronchiale") ma usare invece le aliquote successive ("frazione alveolare"). La frazione bronchiale può essere utilizzata per ricerche di patogeni obbligati: *Legionella* spp., *M. tuberculosis* ...

2.10 Lavaggio bronco-alveolare mirato con cateterino

possibilità diagnostiche:

- vale quanto detto per il Lavaggio bronco-alveolare. Si tratta di metodica altamente sensibile, evitando la contaminazione del materiale con flora orofaringea e permettendo la coltura di microrganismi in carica assai ridotta. Può essere effettuata sia con l'ausilio del fibrobroncoscopio che permette la visualizzazione del catetere nell'area interessata oppure senza fibrobroncoscopio [in questo caso il catetere si dirigerà al lobo inferiore destro (87% circa dei casi), al lobo inferiore sinistro (11% circa) ovvero si arrotolerà su se stesso (2% circa)]. Può essere effettuata anche con cateterino dotato di palloncino gonfiabile all'estremità (Pro-BAL).
- Rispetto alla coltura del *brushing* bronchiale risulta metodica meno costosa. È consigliabile effettuare in un primo momento il prelievo, con cateterino, per gli esami colturali batteriologici e successivamente, a prelievo batteriologico ultimato, procedere all'anestesia del paziente ed all'esecuzione di prelievi per esami citologici.
- oltre a consentire lo studio dei fenomeni infiammatori ed immunitari, è metodica indicata per le ricerche batteriologiche, fungine, parassitologiche e virologiche. Per l'esame microbiologico del materiale da lavaggio broncoalveolare sono necessari almeno 10 mL.

prelievo:

1. porre il paziente in posizione supina;
2. sottoporre il paziente ad anestesia e sedazione leggera (possibilmente evitare l'impiego di xylocaina). È consigliabile somministrare l'anestetico per *aerosol* piuttosto che per iniezione, poiché l'iniezione è modalità non scevra da rischio di contaminazione;
3. inserire il broncoscopio, dotato di catetere a doppio lume con cateterino interno, telescopico, tamponato con glicole polietilenico all'estremità distale allo scopo di prevenire eventuali contaminazioni del materiale di prelievo;
4. inserire la punta del broncoscopio in un bronco segmentale, evitando di aspirare prima della manovra successiva;

5. spingere la camicia esterna del catetere per circa 3 cm al di là della parte distale del broncoscopio. In alternativa: iniettare 5 cc di aria prima di effettuare la manovra;
6. spingere il cateterino interno nella camicia interna del catetere;
7. raccordare una siringa all'estremità esterna del catetere;
8. iniettare soluzione salina sterile (NaCl 0,9%, pH 7.0) isotermica (35°C) per un quantitativo pari a circa 15-20 mL;
9. aspirare, dopo il lavaggio, la soluzione fisiologica (1-3 mL) per le indagini microbiologiche;
10. estrarre il catetere.

2.11 *Plugged telescoping catheter* (PTC)

possibilità diagnostiche:

- metodica altamente sensibile, potendosi evitare la contaminazione del materiale con flora orofaringea e permettendo la coltura di microrganismi in carica assai ridotta. Può essere effettuata sia "alla cieca", senza fibrobroncoscopio, che con l'ausilio del fibro-broncoscopio che permette la visualizzazione dell'area interessata.
- questa tecnica è indicato in tutti i pazienti con abbondanti secrezioni e in coloro per i quali il BAL non è indicato (pazienti gravemente ipossici), che possono avvalersi del PTC "alla cieca" con minima invasività. Non è procedura indicata per prelievi parassitologici o virologici ed ha bassa sensibilità in soggetti già sottoposti a terapia antibiotica
- l'esame microbiologico viene condotto sul materiale aspirato ripetutamente a livello dei bronchioli terminali ("alla cieca" o in sede mirata).

prelievo:

1. porre il paziente in posizione supina;
2. sottoporre il paziente ad anestesia e sedazione leggera (possibilmente evitare l'impiego di xylocaina); consigliabile somministrare l'anestetico per *aerosol* ;
3. inserire il broncoscopio, dotato di catetere a doppio lume con cateterino interno, telescopico, tamponato con glicole polietilenico all'estremità distale allo scopo di prevenire eventuali contaminazioni del materiale di prelievo;
4. inserire la punta del broncoscopio in un bronco segmentale, evitando di aspirare prima della manovra successiva;
5. spingere la camicia esterna del catetere per circa 3 cm al di là della parte distale del broncoscopio;
6. spingere il cateterino interno nella camicia interna del catetere;
7. eseguire 3-4 aspirazioni del materiale presente tramite aspirazione con siringa da 10 mL collegata al broncoscopio;
8. introiettare il cateterino ed estrarre il broncoscopio;
9. spingere il cateterino interno in una provetta sterile con tappo a vite (senza toccare le pareti della provetta con le pareti del broncoscopio);
10. raccordare una siringa all'estremità esterna del broncoscopio;
11. iniettare soluzione nel lume interno 1 mL di soluzione salina sterile (NaCl 0,9%, pH 7.0) isotermica (35°C): tale liquido si recupera nella provetta sterile in cui è stato spinto il cateterino;
12. tagliare, con forbici sterili, i 3 cm terminali del cateterino all'interno della provetta sterile, che va quindi riavvitata e inviata al laboratorio.

2.12 Spazzolatura endobronchiale protetta (*Protected Specimen Brush*, PSB)

possibilità diagnostiche:

- la tecnica del PSB, sviluppata da Wimberley alla fine degli anni '70 del XX secolo, consente un accesso diretto alle vie aeree inferiori attraverso il fibrobroncoscopio ed il recupero di secrezioni respiratorie non contaminate. Il *brushing* è costituito da una spazzola protetta da un doppio catetere telescopico, provvista di un tappo di glicole polietilenico riassorbibile all'interno della punta della camicia più esterna. Viene inserito nel canale operativo del fibrobroncoscopio e può essere portato (preferibilmente sotto controllo radiologico) direttamente nella sede dell'infezione mantenendo la sterilità della spazzola e permettendo di recuperare secrezioni non contaminate dalla flora orofaringea;
- vale quanto detto per il Lavaggio bronco-alveolare. Si tratta di metodica altamente sensibile, evitando la contaminazione del materiale con flora orofaringea e permettendo la coltura di microrganismi anche se presenti in carica assai ridotta. È particolarmente indicato in caso di colture virali.

prelievo:

1. porre il paziente in posizione supina;
2. sottoporre il paziente ad anestesia e sedazione leggera, possibilmente evitando l'impiego di xylocaina. È consigliabile somministrare l'anestetico per *aerosol* piuttosto che per iniezione, poiché l'iniezione è modalità non scevra da rischio di contaminazione;
3. aspirare delicatamente con un sondino da aspirazione le secrezioni presenti in orofaringe o nel tubo di ventilazione (se il paziente è ventilato) per eliminare la maggior parte delle secrezioni che rischierebbero di contaminare il prelievo;
4. inserire il broncoscopio per via trans-nasale o per via trans-orale nel caso di pazienti non intubati. Inserire il broncoscopio attraverso il tubo endotracheale nel caso di pazienti intubati;
5. posizionare il broncoscopio fino ad incunearlo nel bronco sede del processo infiammatorio (sulla base dell'*imaging* toracico e/o sul riscontro visivo endoscopico);
6. prelevare lavaggi bronchiali prima di eseguire il prelievo dello spazzolato: ciò riduce il rischio di un eccesso di sangue nel liquido recuperato;
7. introdurre il PSB nel canale operativo del broncoscopio precedentemente posizionato spingendo la spazzolina protetta almeno 2 cm oltre la punta del broncoscopio;
8. espellere il tappo riassorbibile distale mediante protrusione della cannula interna;
9. far avanzare la spazzola, ormai libera, di 2-4 cm al di fuori della cannula interna, nel contesto dell'addensamento parenchimale, cercando di compiere dei movimenti di va-e-vieni per alcuni secondi;
10. ritirare la spazzolina di alcuni centimetri nella stessa cannula interna;
11. sfilare delicatamente il PSB dal canale operativo del broncoscopio;
12. disinfettare con alcool 70° la superficie esterna della camicia esterna;
13. spingere la camicia interna all'interno di quella esterna;
14. spingere la spazzola all'interno della camicia interna;

15. tagliare la spazzola sterilmente, ponendola in una provetta sterile contenente 1 mL di soluzione fisiologica sterile.

2.13 Aspirato transcricotiroideo

possibilità diagnostiche:

- la manovra di aspirazione transtracheale attraverso la membrana cricotiroidea evita la contaminazione orofaringea. I rischi di complicanze (emottisi) sono possibili. La sensibilità e la specificità della metodica sono elevatissime. La manovra richiede esperienza tecnica e deve essere riservata a casi clinici assolutamente selezionati.
- è metodica indicata per le ricerche batteriologiche, fungine, parassitologiche e virologiche.

prelievo:

1. iperestendere il capo del paziente e posizionare un cuscino sotto le spalle;
2. disinfettare l'area cricotiroidea con polivinilpirrolidone-iodio;
3. eseguire anestesia di superficie;
4. inserire un ago 14 *gauge* nella regione cricotiroidea (alternativamente: inserire un'agocannula, ritirando l'ago e lasciando in sede il catetere);
5. connettere una siringa da 30 mL al catetere di polietilene;
6. iniettare 1-2 mL di soluzione fisiologica sterile (NaCl 0,9%, pH 7.0);
7. estrarre rapidamente il pistone della siringa;
8. sfilare il catetere ed applicare una pressione sul sito di ingresso;
9. travasare il materiale aspirato in una provetta sterile.

2.14 Biopsia transbronchiale

possibilità diagnostiche:

- la biopsia con pinza a bordi taglienti, fenestrata, eseguita, o meno, sotto controllo radioscopico, dopo individuazione approssimativa, su base radiologica, dell'area da prelevare, permette il prelievo di materiale polmonare. La metodica è tecnicamente impegnativa per la necessità di utilizzare l'amplificatore di brillanza. Il prelievo trova le maggiori indicazioni per esami di tipo istologico più che microbiologico;
- il rischio di complicanze, in mani esperte, è modesto. Tuttavia, non deve essere sottovalutata la possibilità di pneumotorace e sanguinamento. Dopo il prelievo bioptico, è consigliabile verificare che non sia in corso un'estesa emorragia prima di ritirare il tubo del broncoscopio.
- diagnosi eziologica di polmonite è possibile nel 40-70% dei casi. Le maggiori indicazioni si hanno per l'accertamento di infezioni da micobatteri, miceti e *P. jirovecii;*
- un radiogramma del torace è obbligatorio e deve essere praticato qualche ora dal termine della procedura.

prelievo:

1. inserire il broncoscopio per via trans-nasale o per via trans-orale nel caso di pazienti non intubati. Inserire il broncoscopio attraverso il tubo endotracheale nel caso di pazienti intubati;
2. inserire la punta del broncoscopio in un bronco segmentale;
3. inserire nel canale deputato alla biopsia del broncoscopio la pinza da biopsia, dirigendola nell'area interessata dal processo patologico sotto controllo scopico, preferibilmente con una valutazione multiplanare (TC);

4. prelevare il materiale bioptico con pinza attraverso il canale del broncoscopio deputato alla biopsia;
5. inserire il campione in provetta sterile con 1 mL di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%).

2.15 Agobiopsia polmonare transparietale

possibilità diagnostiche:

- la puntura-biopsia transparietale deve essere riservata al caso di opacità sviluppatesi a contatto con la parete toracica (nel caso di fallimento degli altri metodi diagnostici) e di pneumopatie croniche diffuse e deve essere effettuata sotto scopia o guida tomografica. Il prelievo trova le maggiori indicazioni per esami di tipo istologico più che microbiologico;
- la metodica è gravata da rischi non trascurabili (in particolare: pneumotorace e sanguinamento). Deve essere evitata in modo assoluto in caso di: diatesi emorragica, ipertensione polmonare, pneumonectomia controlaterale e di anomalia vascolare, di cisti idatidea. Controindicazioni relative sono il riscontro di insufficienza cardiaca o respiratoria, di enfisema bolloso e di patologia cardiaca severa. Dopo l'esecuzione del prelievo alcuni Autori suggeriscono l'esecuzione di un radiogramma, per accertare un eventuale pneumotorace o emopneumotorace;
- il campione, suddiviso in due aliquote, andrà indirizzato al Laboratorio di Anatomia Patologica (fissato in formalina) ed a quello di Microbiologia Clinica (conservazione in una minima quantità di soluzione fisiologica) per le indagini microbiologiche. Si sottolinea che gli esami microbiologici non sono possibili se il materiale perviene in contenitore con formalina.

prelievo:

1. effettuare anestesia locale con xylocaina 2%;
2. utilizzare aghi di 12/10-15/10 mm di diametro montati su siringa (da 20 mL) sterile a perfetta tenuta, contenente una piccola quantità di soluzione fisiologica (alternativamente: usare un trequarti di Küss, estraendo il mandrino ad ago introdotto ed innestando una siringa a tenuta);
3. evidenziare sotto scopia l'area ove eseguire il prelievo (in caso di lesioni diffuse procedere alla puntura nel cavo ascellare a livello del 3° spazio intercostale oppure sulla faccia posteriore del lobo inferiore destro);
4. prelevare frustoli di 1-3 mm, se possibile;
5. trasferire i frustoli in contenitori sterili, addizionati di pochi millilitri di soluzione fisiologica (non usare formalina).

2.16 Agoaspirato polmonare (biopsia polmonare con ago fine)

possibilità diagnostiche:

- questa metodica trova la massima applicazione per la diagnostica citologica. Di minore rilevanza sono le indicazioni al prelievo per esami microbiologici. La metodica è meno traumatica per il paziente;
- la metodica presenta gli stessi rischi descritti per l'agobiopsia polmonare transparietale;
- il campione, suddiviso in due aliquote, andrà indirizzato al Laboratorio di Anatomia Patologica (fissato in formalina) ed a quello di Microbiologia Clinica (conservazione in una minima quantità di soluzione fisiologica) per le indagini microbiologiche.

prelievo:

1. evidenziare sotto scopia l'area ove eseguire il prelievo;
2. inserire un ago fine (20-22 *gauge*) attraverso la parete toracica nell'infiltrato polmonare;
3. aspirare con la siringa il materiale dalla lesione: se la lesione è diffusa o le aree infiltrate sono multiple, prelevare più campioni.

2.17 Biopsia polmonare a cielo aperto

possibilità diagnostiche:

- la biopsia polmonare a cielo aperto si impone qualora, in presenza di lesioni nodulari, altre tecniche diagnostiche non abbiano dato alcun esito diagnostico;
- la metodica presenta gli stessi rischi descritti per l'Agobiopsia polmonare transparietale;
- il campione, suddiviso in due aliquote, andrà indirizzato al Laboratorio di Anatomia Patologica (fissato in formalina) ed a quello di Microbiologia Clinica (conservazione in una minima quantità di soluzione fisiologica) per le indagini microbiologiche. Si sottolinea che gli esami microbiologici non sono possibili se il materiale perviene in contenitore con formalina.

prelievo:

1. eseguire le valutazioni preliminari previste per ogni intervento chirurgico (bilancio pre-operatorio; valutazione anestesiologica; anestesia in intubazione, ...);
2. praticare una toracotomia estesa per incisione del 4° o del 5° spazio intercostale;
3. prelevare frustoli di 1-3 cm^3, se possibile;
4. trasferire i frustoli in contenitori sterili, addizionati di pochi millilitri di soluzione fisiologica (non usare formalina).

2.18 Biopsia pleurica

possibilità diagnostiche:

- si tratta di esame semplice, meglio se eseguito sotto guida pleuroscopica, in anestesia locale;
- il prelievo è controindicato nei pazienti affetti da diatesi emorragiche e da forme ad eziologia batterica;
- il ricorso a questa modalità di prelievo è indicata esclusivamente per la ricerca mirata di *Mycobacterium tuberculosis* e micobatteri atipici. Si sottolinea che gli esami microbiologici non sono possibili se il materiale perviene in contenitore con formalina.

prelievo:

1. effettuare anestesia locale con xylocaina 2%;
2. utilizzare aghi di diametro diverso montati su siringa (da 20 mL) sterile a perfetta tenuta, contenente una piccola quantità di soluzione fisiologica;
3. evidenziare, eventualmente sotto scopia (o tomografia), l'area ove eseguire il prelievo;
4. prelevare frustoli di pleura parietale di 1-3 mm^2, se possibile;

5. trasferire i frustoli in contenitori sterili, addizionati di pochi millilitri di soluzione fisiologica (non usare formalina) per le indagini microbiologiche.

2.19 Liquido pleurico

possibilità diagnostiche:

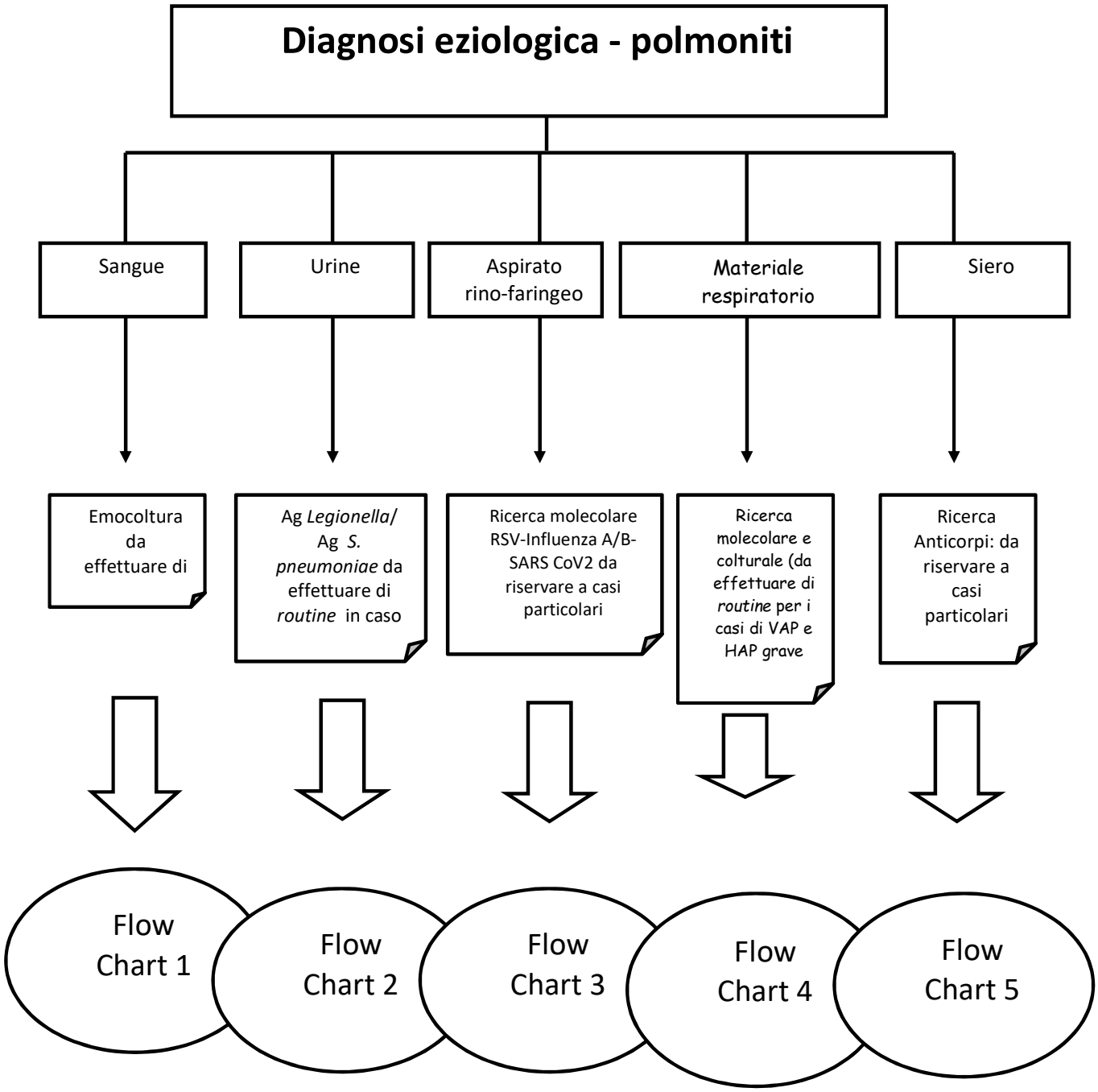
- la raccolta di liquido pleurico è indicata qualora siano presenti versamenti pleurici in corso di polmonite. Il campione è per definizione sterile: un risultato positivo può comportare indicazioni terapeutiche immediate. La toracentesi riveste anche caratteri di manovra evacuativa a fini terapeutici, in caso di esteso versamento;
- il prelievo deve essere eseguito con prudenza in caso di anomalie della coagulazione. Dopo l'esecuzione del prelievo alcuni Autori suggeriscono l'esecuzione di un radiogramma, per accertare un eventuale pneumotorace (5% dei casi);
- è possibile effettuare la ricerca dei batteri (esame colturale "di *routine*"), di batteri anaerobi, di *Legionella* spp., di *Mycobacterium* spp., di *Nocardia* spp., di *C. neoformans* e di miceti dimorfi. Talora è possibile isolare microrganismi rappresentativi della flora cutanea (*Cutibacterium acnes*, stafilococchi coagulasi negativi) il cui ruolo deve essere criticamente valutato.

prelievo:

1. disinfettare la cute nella sede di prelievo e procedere all'anestesia locale;
2. inserire una siringa sterile da 50 mL con ago da 14-18 *gauge* immediatamente sopra l'ultima costa dove è possibile reperire il versamento (la linea ascellare posteriore costituisce il repere verticale ottimale);
   in alternativa utilizzare rubinetto a tre vie;
3. prelevare (se possibile) 10-40 mL di liquido;
4. trasferire il contenuto della siringa (prima aliquota) in un contenitore sterile (coltura per microrganismi a metabolismo aerobio) e (seconda aliquota) in un contenitore idoneo alla conservazione del materiale finalizzato anche alla coltura di microrganismi anaerobi.

Allegato 2

LE *FLOW CHART* OPERATIVE

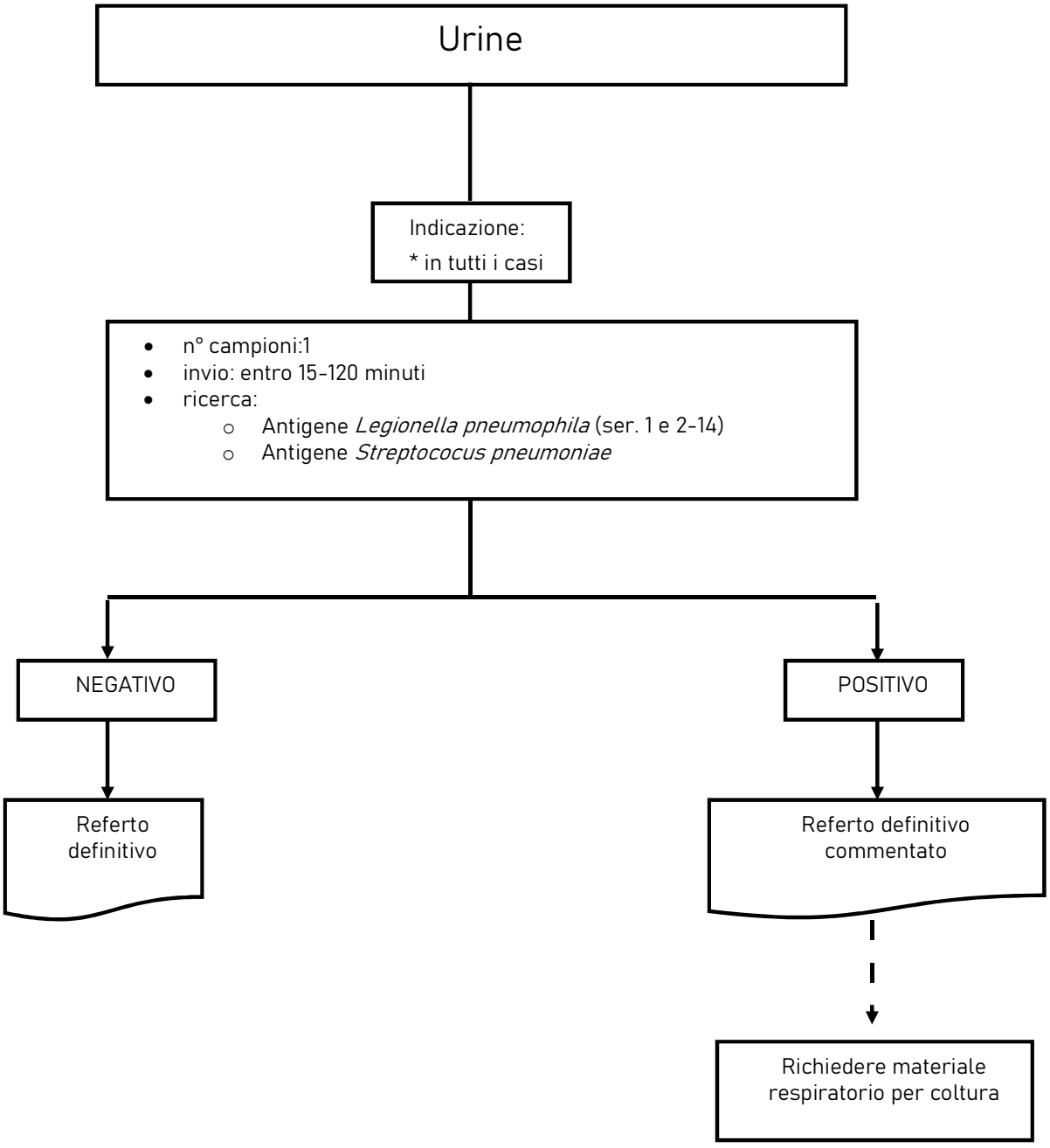


Flow Chart 1: emocoltura

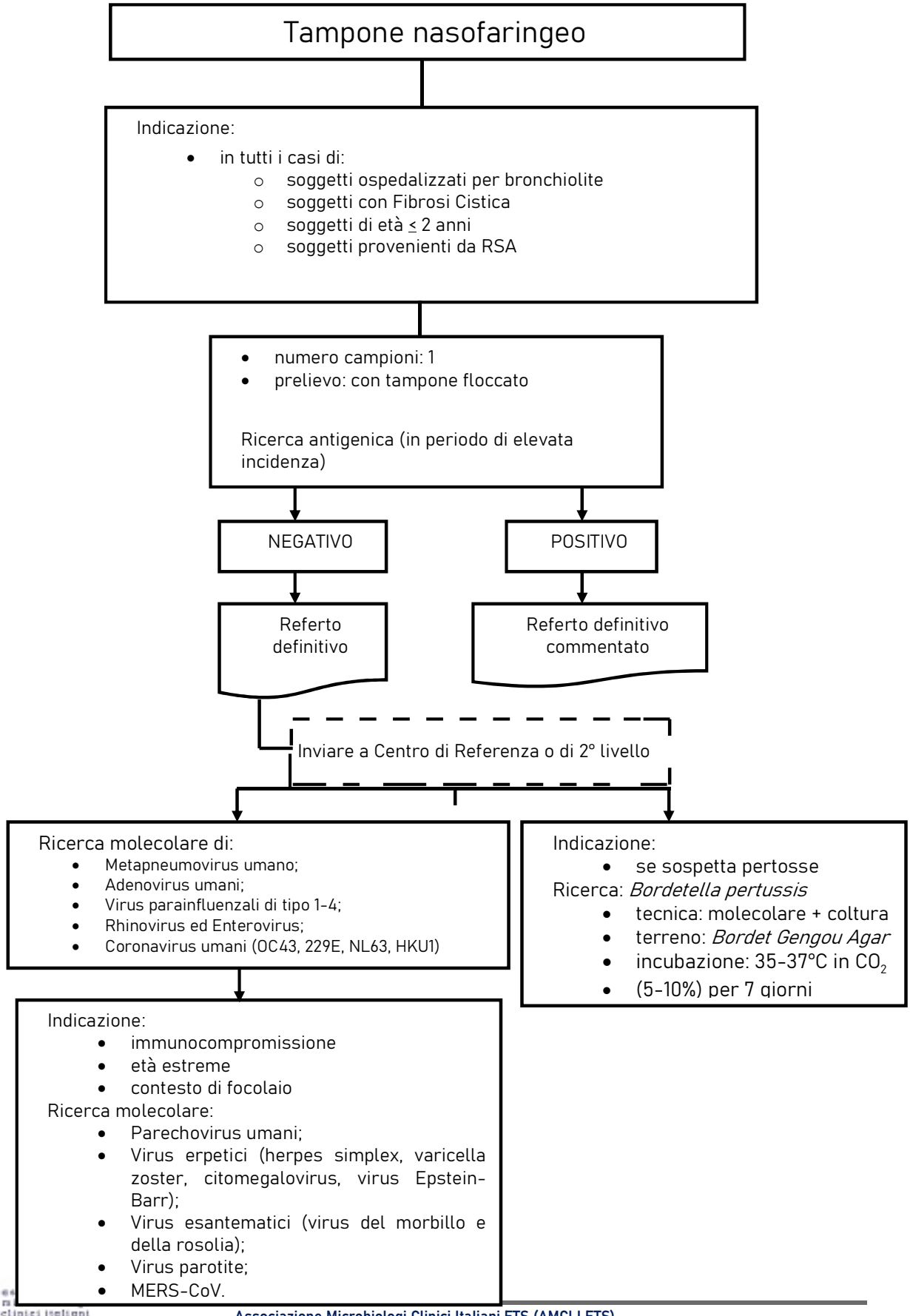
Cfr:

AMCLI ETS. Percorso diagnostico "Infezioni del torrente circolatorio" – rif 2023-13. https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/

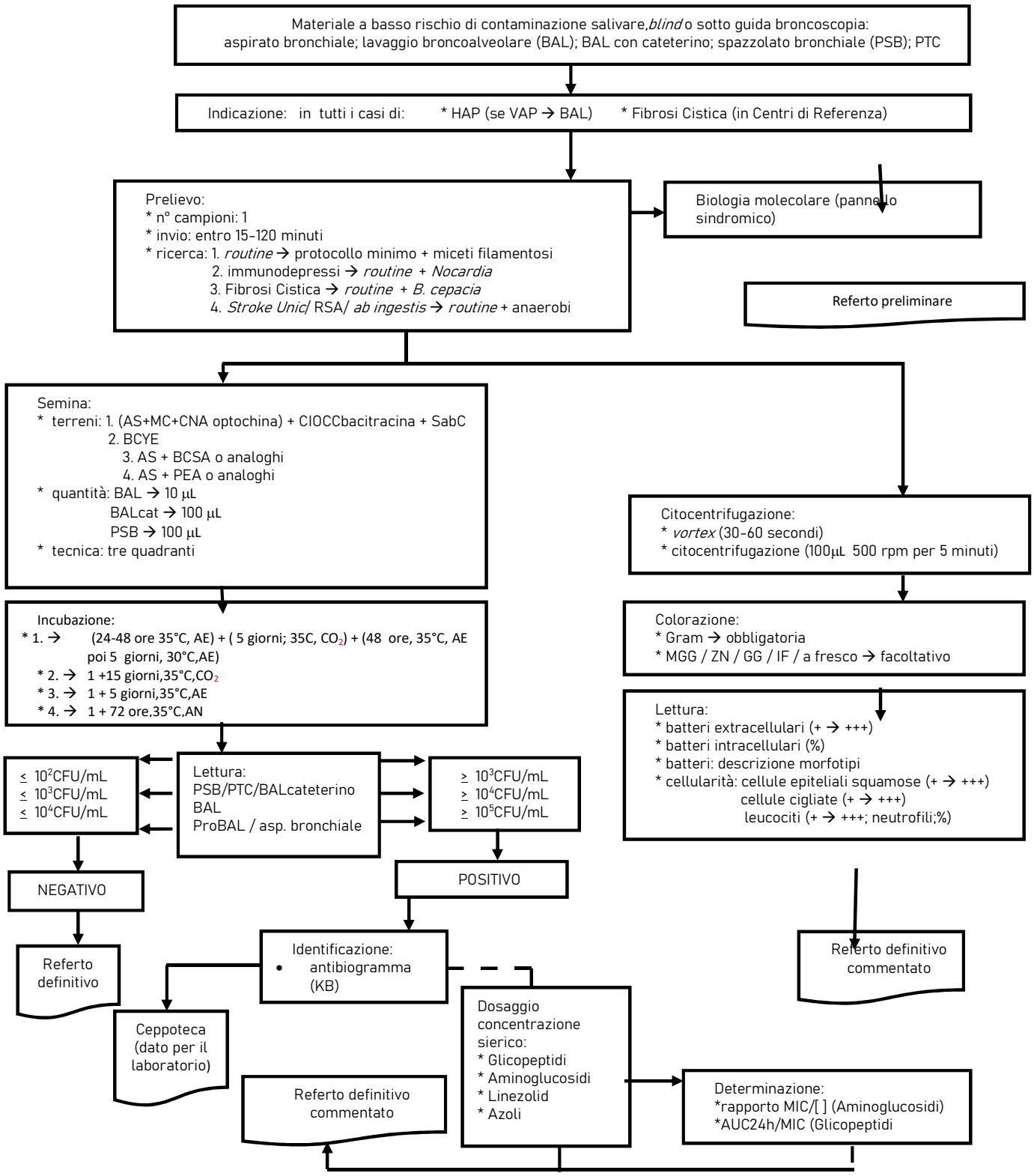
Flow Chart 2



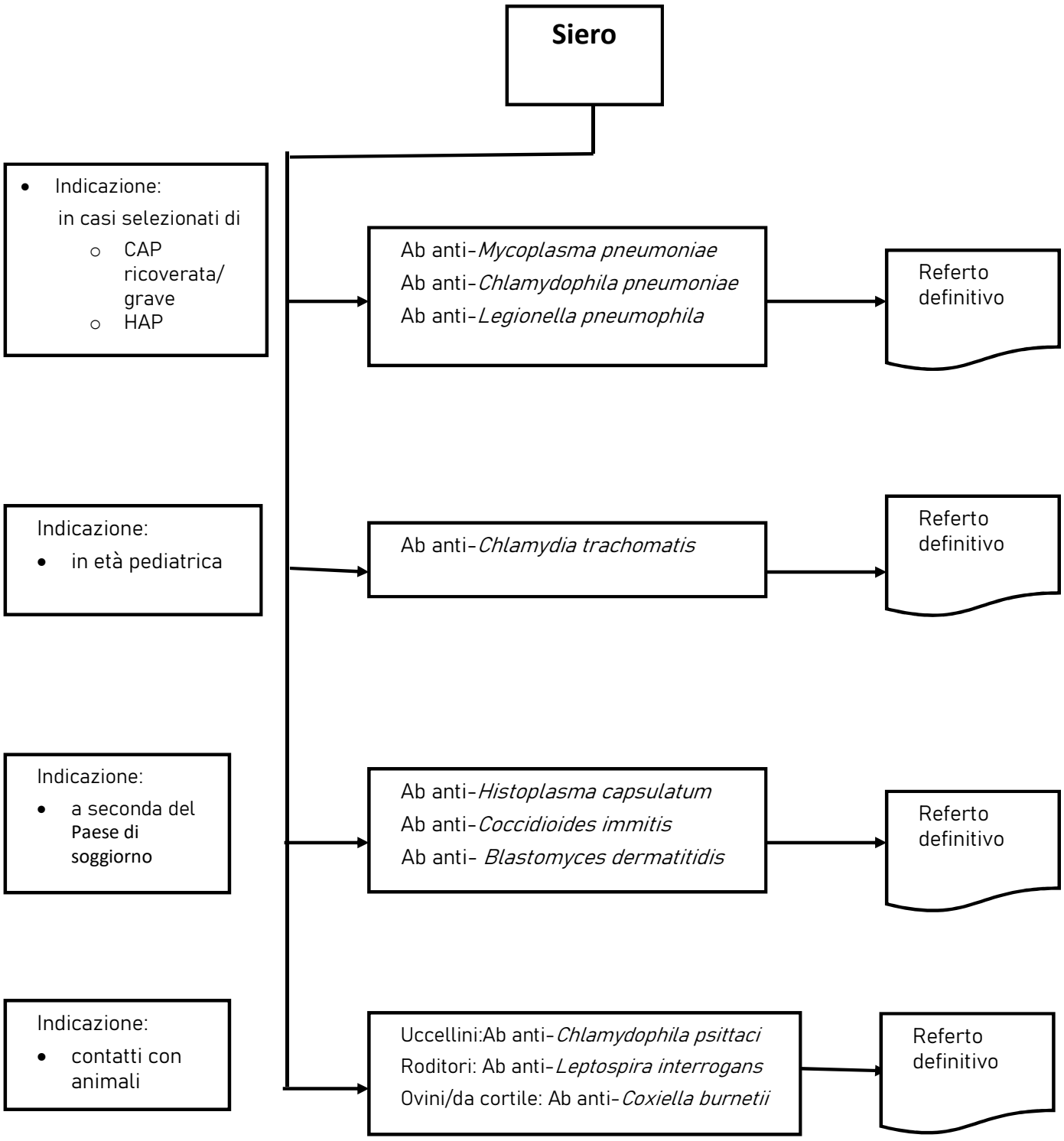
Flow Chart 3


Tampone nasofaringeo
Indicazione:
in tutti i casi di:
soggetti ospedalizzati per bronchiolite
soggetti con Fibrosi Cistica
soggetti di età ≤ 2 anni
soggetti provenienti da RSA
numero campioni: 1
prelievo: con tampone floccato
Ricerca antigenica (in periodo di elevata incidenza)
NEGATIVO
POSITIVO
Referto definitivo
Referto definitivo commentato
Inviare a Centro di Referenza o di 2° livello
Ricerca molecolare di:
Metapneumovirus umano;
Adenovirus umani;
Virus parainfluenzali di tipo 1-4;
Rhinovirus ed Enterovirus;
Coronavirus umani (OC43, 229E, NL63, HKU1)
Indicazione:
immunocompromissione
età estreme
contesto di focolaio
Ricerca molecolare:
Parechovirus umani;
Virus erpetici (herpes simplex, varicella zoster, citomegalovirus, virus Epstein-Barr);
Virus esantematici (virus del morbillo e della rosolia);
Virus parotite;
MERS-CoV.
Indicazione:
se sospetta pertosse
Ricerca: *Bordetella pertussis*
tecnica: molecolare + coltura
terreno: *Bordet Gengou Agar*
incubazione: 35-37°C in CO_2
(5-10%) per 7 giorni

Flow Chart 4 materiali respiratori 'protetti'



Flow Chart 5


Siero
Indicazione:
in casi selezionati di
CAP ricoverata/ grave
HAP
Ab anti-Mycoplasma pneumoniae
Ab anti-Chlamydophila pneumoniae
Ab anti-Legionella pneumophila
Referto definitivo
Indicazione:
in età pediatrica
Ab anti-Chlamydia trachomatis
Referto definitivo
Indicazione:
a seconda del Paese di soggiorno
Ab anti-Histoplasma capsulatum
Ab anti-Coccidioides immitis
Ab anti- Blastomyces dermatitidis
Referto definitivo
Indicazione:
contatti con animali
Uccellini:Ab anti-Chlamydophila psittaci
Roditori: Ab anti-Leptospira interrogans
Ovini/da cortile: Ab anti-Coxiella burnetii
Referto definitivo

Allegato 3

I MATERIALI RESPIRATORI: LA FASE ANALITICA E LA REFERTAZIONE

1. Norme generali

All'arrivo presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica deve essere verificata la correttezza della fase pre-analitica (raccolta, conservazione ed invio del materiale).

In taluni casi potrà essere indicata, oltre alla colorazione di Gram, anche l'esecuzione di un esame a fresco o dopo specifiche colorazioni sul materiale, per evidenziare particolari strutture cellulari o microbiche.

Le indagini (per ricerca diretta di ricerca batteri e miceti) prevedono un protocollo minimo di ricerche colturali, associate alla determinazione, quantitativa della carica batterica.

a. Carica batterica: gli agenti eziologici di polmonite sono generalmente presenti in alte concentrazioni nelle secrezioni respiratorie (≥10^5-10^6 UFC/mL) e nei tessuti (≥10^4 UFC/g di tessuto); la flora contaminante delle alte vie superiori è invece presente in concentrazioni più basse (< 10^4 UFC/mL) quando il materiale è raccolto correttamente. La determinazione della carica batterica consente così di discriminare la popolazione microbica responsabile di infezione da quella verosimilmente contaminante.
b. Protocollo minimo: è indirizzato alla ricerca di: Enterobacterales, Bacilli Gram-negativi non fermentanti il glucosio, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes.* La ricerca di microorganismi anaerobi deve, invece, essere limitata solo ad alcuni materiali.

Le indicazioni sottoriportate fanno riferimento al protocollo minimo di ricerche batteriologiche sopra riportato che deve sempre essere applicato.
Ulteriori ricerche, trattate nel paragrafo "Ricerche particolari", dovranno essere effettuate solo in casi selezionati.
Nel caso in cui il campione pervenga al laboratorio dopo più di 2 ore dal prelievo, commentare: "L'esame colturale è eseguito su un campione prelevato da più di 2 ore: i risultati microbiologici possono risultarne falsati e debbono essere interpretati alla luce del quadro clinico".

2. Microrganismi correlati alle forme cliniche di polmonite

Si riportano, in modo assolutamente sommario e non necessariamente esaustivo, i microrganismi descritti quali agenti eziologici di polmonite.

2.1 Eziologia delle CAP

Batteri: *Actinomyces* spp, anaerobi orali, *Bacillus anthracis, Bordetella* spp., *Chlamydia trachomatis, Chlamydiophila pneumoniae, Chlamydiophila psittaci, Francisella turalensis, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, Legionella* spp., *Leptospira interrogans, Moraxella catarrhalis, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis*, *Nocardia* spp., *Pseudomonas pseudomallei, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Yersinia pestis*;
Miceti: *Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans Histoplasma capsulatum*;
Virus: *Orthomyxoviridae* (genere: Influenzavirus A, B e C), *Paramyxoviridae* (genere Respirovirus: *Human parainfluenza* virus tipo 1 e 3; genere Rubulavirus: *Human parainfluenza* virus tipo 2, 4; virus della parotite; genere Morbillivirus: virus del morbillo), *Pneumoviridae* (genere Orthopneumovirus: Human Respiratory Syncytial Virus, RSV; genere Metapneumovirus: Human Metapneumovirus, hMPV); Picornaviridae (genere Enterovirus: Human enterovirus A-D come *Coxsackievirus* A e B, Echovirus, Enterovirus 68-71, 104, 117;e Human Rhinovirus A, B e C; genere

Parechovirus: Human parechovirus;), *Adenoviridae* (genere: Mastadenovirus), *Parvoviridae* (genere: Bocavirus, hBoV) e *Coronaviridae* (Coronavirus: 229E, OC43, NL63 e HKU1, SARS, MERS), Bocavirus.

2.2 Eziologia delle CAP del soggetto immunocompromesso

Batteri: Enterobacterales*, Legionella* spp, *Mycobacterium* spp*., Nocardia* spp, *Pseudomonas* spp e bacilli gram-negativi non fermentanti il glucosio, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae;*
Miceti: *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans, Fusarium* spp, miceti dematiacei, *Pneumocystis jiroveci,* zigomiceti;
Parassiti: *Cryptosporidium parvum, Dirofilaria immitis, Microsporidium* spp., *Strongyloides stercoralis, Toxoplasma gondii;*
Virus: *Cytomegalovirus, Hantavirus*.

2.3 Eziologia delle CAP da aspirazione

Batteri: *Fusobacterium nucleatum,* Enterobacterales*, Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas asaccharolytica, Prevotella melaninogenica, Pseudomonas* spp.

3. Materiali ad alto rischio di contaminazione con saliva

(Espettorato; Espettorato indotto; Espettorato protetto; Aspirato endotracheale; Aspirato da tracheostomia; Lavaggio bronchiale)

3.1 Premessa

Sui materiali di provenienza dalle basse vie aeree che possono essere contaminati da saliva è imperativa la valutazione preliminare della qualità del campione, allo scopo di evitare l'esame di materiali poco rappresentativi della lesione e, conseguentemente, la refertazione ai Clinici di risultati potenzialmente inesatti e devianti. Fanno eccezione in casi di prelievo finalizzato alla coltura di *Legionella* spp ed i campioni da pazienti con fibrosi cistica.

3.2 Esame microscopico

A. Preparazione dello striscio

- pre-riscaldare un vetrino portaoggetti (evita l'interferenza della fibrina);
- scegliere porzioni purulente del campione;
- stendere il materiale a velo sottile su vetrino, preferibilmente operando in cabina a flusso laminare;
- lasciare asciugare all'aria, preferibilmente operando in cabina a flusso laminare;
- fissare preferibilmente con metanolo per 2-3 minuti (in alternativa: fissare alla fiamma).

B Colorazione di Gram

- secondo le metodiche in uso;

C Lettura del Gram

- esaminare almeno 10 campi (x100), scegliendo quelli più significativamente ricchi di materiale;
- determinare il numero medio di ciascun tipo di globuli bianchi (GB) e cellule epiteliali squamose (CS);
- calcolare il punteggio "Q" (*Q score*) sulla base della tabella seguente:

Cellule epiteliali squamose (CS)

Lettura del Gram		no	1-9	10-24	> 25
	Referto	0	+	++	+++
Leucociti (GB) no	0	0	- 1	- 2	- 3
1-9	+	+ 1	0	- 1	- 2
10-24	++	+ 2	+ 1	0	- 1
> 25	+++	+ 3	+ 2	+ 1	0
		Punteggio "Q"			

D Decisioni sulla base del punteggio "Q"

A. Punteggio Q ≤ 0

In questo caso:

(1) Esame microscopico a immersione (x1000): non eseguire;

(2) Non procedere ad indagini colturali.

(3) Procedere alla refertazione definitiva:

- riportare i risultati dell'esame microscopico (determinazione semiquantitativa di globuli bianchi e cellule epiteliali di sfaldamento, vedi 2.1, tab 1);
- commentare: "L'esame colturale non è eseguito: il campione non è rappresentativo di secrezioni delle basse vie aeree. Si consiglia di valutare l'opportunità di inviare nuovo campione".
- in caso di prelievi effettuati a soggetti con Fibrosi Cistica commentare: "Il campione inviato non è rappresentativo di secrezioni delle basse vie aeree. L'esame colturale è tuttavia eseguito per la valutazione selettiva della colonizzazione microbica".

B. Punteggio Q ≥ 1

Procedere a:

(1) Esame microscopico a immersione (x1000):

- descrizione qualitativa e semiquantitativa dei batteri, concentrandosi sulle aree dove sono più presenti i leucociti;

(2) Lettura del Gram:

- tipo e quantità delle cellule (ad esempio: Leucociti +++, Cellule epiteliali squamose +);
- morfotipi microbici rilevati all'esame diretto sec. Gram: interpretare i risultati procedendo alla media di almeno 10 campi, come di seguito indicato:

	Gram	Referto
Microrganismi	<1	+
	1-2	++
	3-10	+++
	>10	++++

(3) Esame colturale: da effettuare sempre come indicato ai paragrafi 2.3 e 2.4.

(4) Procedere alla refertazione preliminare:

- riportare i risultati dell'esame microscopico x1000 (determinazione semiquantitativa di leucociti e di cellule epiteliali di sfaldamento);

- segnalare la presenza di batteri o miceti, descrivendo i morfotipi presenti, e la carica. In particolare:
  (1) se si rileva la presenza di una popolazione microbica monomorfa: riferire il morfotipo: es. "Bacilli Gram negativi + (o ++, +++, ++++)";
  (2) se si rileva la presenza di una popolazione microbica predominante: riferire il morfotipo predominante: es. "Bacilli Gram negativi + (o ++, +++, ++++)"; nel caso siano presenti anche altri morfotipi, aggiungere la nota: "Presenza anche di flora batterica mista: + (o ++, +++, ++++)";
  (3) Se non è apprezzabile un morfotipo predominante, riferire: "Presenza di popolazione microbica mista all'esame microscopico diretto: + (o ++, +++, ++++)";
  (4) Se non si apprezza alcun morfotipo microbico, refertare "Morfotipi microbici non apprezzabili all'esame microscopico diretto".
- commentare: "La valutazione del Q *score* effettuata con l'esame microscopico diretto del campione rileva che il materiale inviato è rappresentativo delle basse vie aeree: i risultati dell'esame colturale devono essere interpretati alla luce del quadro clinico".

3.3. Pretrattamento del campione (fluidificazione)

- scegliere le parti più purulente del campione;
- trattare il materiale con omogeneizzatore oppure diluire 1:1 (v/v) con ditiotreitolo, lasciando il campione per 60 minuti a temperatura ambiente o per 30 minuti in termostato a 35-37°C.

3.4. Esame colturale

A. Terreni:

(1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone):

(2) *MacConkey* o altro terreno selettivo-differenziale per Enterobacterales e Bacilli Gram Negativi non fermentanti il glucosio

(3) *Agar* sangue (5%, di montone) con colistina ed acido nalidixico (CNA) con optochina (dischetto);

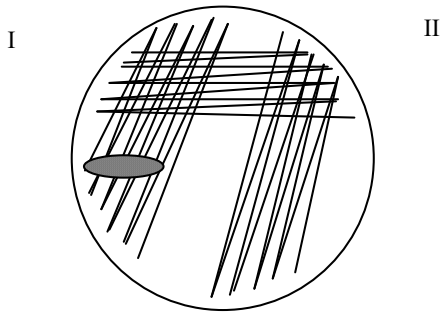
(4) *Agar* cioccolato con bacitracina (nel terreno o dischetto) o TSA+BVX;

(5) *Sabouraud Dextrose Agar* con cloramfenicolo e/o Gentamicina.

B. Semina:

Seminare le piastre usando la tecnica delle "tre zone":

- depositare, con pipetta o direttamente con ansa calibrata, 10 mL e strisciare (5 linee avanti e cinque indietro per ogni quadrante) come di seguito indicato:



C. Incubazione:

1. incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 24 ore: *MacConkey Agar*; *Agar* sangue e *Agar* CNA;
2. incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) per 24 ore: *Agar* cioccolato;
3. esaminare le piastre sopra menzionate dopo 24 ore e procedere ad identificazioni e/o isolamenti;
4. incubare a 35°C in atmosfera aerobia per 48 ore: *Sabouraud Dextrose Agar* con antibiotici;
5. re-incubare, in caso di negatività, le piastre di *MacConkey Agar*, *Agar* sangue, *Agar* CNA e di *Agar* cioccolato, e riesaminarle quotidianamente per altre 48 ore;
6. re-incubare le piastre di *Agar Sabouraud Dextrose* con antibiotici in atmosfera aerobia a 30°C e riesaminarle dopo altri 5 giorni.

D. Quantificazione della crescita:

Carica semiquantitativa	I quadrante	II quadrante	III quadrante	Carica approssimativa (CFU/mL)
+	<10			10^3
++	<10	<10		10^4
+++	>10	>10	<10	10^5
++++	>10	>10	>10	10^6

3.5. Interpretazione dei risultati

Procedere alle identificazioni microbiche se:

(1) Streptococchi α –emolitici → identificare *S. pneumoniae*;

(2) Streptococchi β –emolitici → identificare *S. pyogenes* e, nel neonato, *S. agalactiae;*

(3) *Haemophilus* spp. → identificare solo in caso di assente e scarsa flora salivare o se *Haemophilus* spp. predomina (> 2+) all'esame sec. Gram o nella piastra (ad esempio *Haemophilus* spp +++, altra flora +; *Haemophilus* spp ++++, altra flora ++ o +) ;

(4) Diplococchi Gram negativi→ *Acinetobacter* spp., *Neisseria* spp e *Moraxella* spp : identificare solo se predomina (salto di due +) all'esame sec. Gram o se presenti all'interno dei neutrofili;

(5) Enterobacterales e BNF → identificare solo se sono presenti uno o due tipi di colonie. In caso di più di due tipi di colonie non si procede;

(6) Bacilli Gram positivi → identificare se aspetto tipico delle colonie di *Rhodococcus* spp., *Nocardia* spp. Tra i coriniformi, identificare *C. pseudodiphtericum* e *C. striatum*;;

(7) Miceti filamentosi → identificare.

Nel caso di riscontro di morfotipi compatibili con cocchi Gram positivi e lieviti, procedere solo in accordo con lo schema di seguito indicato:

N° colonie	flora orofaringea (FO)	Azione

+	FO presente o assente	non procedere
++	FO assente oppure patogeno predominante al Gram (> 2+)	identificare
+++/++++	FO presente o assente	identificare

procedendo ad identificare:

(8) *Staphylococcus* spp. → identificare solo *S. aureus*;

(9) *Enterococcus* spp. → identificare;

(10) lieviti → identificare.

3.6 Refertazione dei risultati

Nel referto definitivo devono essere riportati:

- i risultati dell'esame microscopico;
- il/i germe/i identificato;
- l'eventuale antibiogramma;
- eventuali commenti del microbiologo. Ad esempio:

(1) in caso di positività per batteri → "Il riscontro in coltura dei microrganismi identificati non è di per sé rappresentativo dell'eziologia responsabile del quadro clinico. Si consiglia di procedere all'interpretazione del dato colturale su base clinica per le valutazioni circa la necessità/tipo di approccio terapeutico, e di confrontare tale dato con quello dell'esame microscopico diretto e di confermare il risultato inviando complessivamente tre campioni di materiale respiratorio in tre giorni diversi";

(2) in caso di positività per *S. pneumoniae* → "La diagnosi polmonite è posta su criteri clinici e radiologici. Il riscontro in coltura di *S. pneumoniae* non è di per séindicativo di un quadro di polmonite pneumococcica. Si consiglia di procedere all'interpretazione del dato colturale su base clinica per le valutazioni circa la necessità/tipo di approccio terapeutico, e di considerare l'invio complessivo di tre campioni respiratori, in giorni successivi, e di due-tre *set* di emocolture per la conferma colturale, ed di un campione di urine per la rilevazione dell'antigene pneumococcico"

(3) in caso di positività per *Aspergillus* spp. → "Il riscontro in coltura di *Aspergillus* spp. non è di per sé indicativa di un quadro di aspergillosi polmonare. Tale riscontro va inquadrato come possibilmente significativo nell'ambito di specifiche categorie di pazienti a rischio e in associazione a quadri radiologico-clinici indicativi. Si consiglia l'inquadramento clinico specialistico del paziente per valutazione terapeutica, e l'invio di almeno tre campioni respiratori, in giorni successivi, per la conferma colturale, di ulteriori campioni in base al sospetto clinico (per esempio, in caso di paziente con sospetta aspergillosi invasiva, di un campione di siero e di BAL per la rilevazione dell'antigene galattomannano)";

(4) in caso di positività per *Candida* spp. → "Il riscontro in coltura pura di *Candida* spp. è rappresentativo di un quadro di colonizzazione o di infezione da lieviti del cavo orale. Si consiglia di valutare l'eventuale presenza di una mucosite orale";

(5) in tutti i casi → "Si consiglia di valutare, in base agli eventuali riscontri dell'anamnesi epidemiologica (fattori predisponenti, contatti con animali, soggiorni in Paesi di endemia per microrganismi di importazione), l'opportunità di predisporre accertamenti colturali o sierologici per il riscontro di patogeni mirati".

4. Materiali a basso rischio di contaminazione con saliva

(Lavaggio bronco-alveolare; Lavaggio bronco-alveolare mirato con cateterino; Spazzolatura endobronchiale protetta; Aspirato transcricotiroideo)

4.1 Premessa

Sui materiali di provenienza dalle basse vie aeree raccolti con tecniche protette di prelievo, a basso rischio di contaminazione salivare, la valutazione preliminare della qualità non modifica il successivo *iter* dell'esame: pare, però, utile effettuarla in ogni caso per permettere una più accurata interpretazione dei risultati.

4.2 Esame microscopico

A. Preparazione dello striscio

- procedere all'agitazione del campione, soprattutto nel caso di invio di spazzolino o catetere, con *vortex* per 30-60 secondi;
- preparare tre vetrini (o un solo vetrino, provvedendo però a conservare il materiale a +4°C);
- se si dispone di citocentrifuga: allestire un vetrino del citocentrifugato (100 µL a 500 rpm per 5 minuti; in mancanza di citocentrifuga utilizzare il sedimento ottenuto con centrifugazione, stendendo il materiale a velo sottile su vetrino (in presenza di fibrina si consiglia di utilizzare un vetrino pre-riscaldato), preferibilmente operando in cabina a flusso laminare;
- lasciare asciugare i vetrini all'aria (preferibilmente sotto cappa a flusso laminare);
- fissare con metanolo per 2-3 minuti.

B Colorazioni

- secondo le metodiche in uso.

- eseguire sempre:

  (1) Gram, per valutare la popolazione microbica (la sensibilità del *test* è però bassa) e la cellularità (meglio valutabile con la colorazione di May-Grünwald Giemsa);

  (2) due strisci per eventuali ulteriori necessità (oppure conservare il materiale a +4°C);

- da valutare, in relazione al quadro clinico-epidemiologico e alle potenzialità diagnostiche, l'effettuazione di:

  (3) May-Grünwald Giemsa (per valutare la presenza e la conta differenziale delle cellule);

  (4) Colorazione per Bacilli acido-alcool resistenti (Ziehl-Nielsen, Kinyoun o Auramina-rodamina; Ziehl-Nielsen modificato per *Nocardia* spp.);

  (5) Colorazioni per miceti (*Cotton Blue* Lattofenolo, Calcofluor White, Gomori-Grocott o PAS);

  (6) Esame a fresco per ricerca di miceti e parassiti;

  (7) Fluorescenza diretta per *Legionella* spp., Cytomegalovirus, virus respiratori;

  (8) Colorazioni per *Pneumocystis jirovecii* ;

  (9) ricerca di elastina (KOH o citochimica); la presenza fa sospettare un'infezione da Gram negativi;

  (10) altre colorazioni per ricerche specifiche.

C Lettura del Gram

(1). Lettura (a x100 e x1000) e interpretazione

- determinare (obiettivo x10 e oculare x10) il numero di cellule e di batteri in 20-40 campi dello striscio, senza calcolare i campi senza cellule o batteri;
- procedere alla rilevazione dei batteri extracellulari (definendone la carica semiquantitativa) ed intracellulari (registrando la percentuale di polimorfonucleati e macrofagi contenenti microrganismi intracellulari). Infatti, la presenza dei batteri intracellulari in percentuale > 2% è indicativa di polmonite sostenuta da microrganismi corrispondenti ai morfotipi evidenziati all'esame diretto (la negatività non la esclude per la scarsa sensibilità del Gram);
- procedere – ove possibile sulla base delle colorazioni adottate - alla conta differenziale di macrofagi, neutrofili, eosinofili, linfociti, cellule epiteliali bronchiali (se presenti), cellule epiteliali squamose (se presenti). La conta si basa sull'osservazione di almeno 300 cellule, esclusi gli eritrociti (se la cellularità è scarsa, procedere alla conta su due vetrini):
- determinare la presenza di cellule in %;
- cellule cigliate in campioni di prelievi bronchiali o di cellule alveolari in campioni alveolari: il materiale proviene dalle basse vie respiratorie;
- cellule epiteliali squamose nel citocentrifugato (>1%): il materiale è stato verosimilmente contaminato con flora orofaringea;
- segnalare l'eventuale presenza di eritrociti.

D Decisioni sulla base dell'esame microscopico diretto

- riferire tempestivamente (telefonicamente o, meglio, via *e-mail* o *fax* e con referto preliminare in giornata) i risultati dell'esame microscopico. Commentare i risultati come segue:

  (1) a commento dell'esame microscopico, se segni di contaminazione con la mucosa del cavo orale (presenza di flora orofaringea e/o presenza di cellule epiteliali squamose, se >1%) → "La presenza di cellule epiteliali squamose del cavo orale e/o il riscontro in coltura di microrganismi rappresentativi della popolazione microbica del cavo orale depone per la possibile contaminazione durante la raccolta. Si consiglia di valutare i risultati alla luce dei dati clinici";

  (2) a commento dell'esame microscopico, se cellularità rappresentativa delle basse vie aeree → "La presenza, all'esame microscopico diretto, di cellule cigliate conferma la qualità del materiale, di origine dalle basse vie respiratorie. Inoltre, l'eventuale presenza di batteri intracellulari in percentuale > 2% è indicativa di polmonite sostenuta da questi stessi microrganismi. Tuttavia, la negatività dell'esame microscopico non esclude l'eziologia microbica per la scarsa sensibilità del metodo (colorazione sec. Gram)";

4.3 Pretrattamento del campione

(1) Non è richiesta la fluidificazione (nel caso venga effettuata, attenersi a quanto descritto precedentemente);

(2) in presenza di materiale emorragico può essere utile procedere alla lisi degli eritrociti, tenendo conto dell'eventuale diluizione al momento della semina.

4.4 Esame colturale

A. Terreni:

(1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);

(2) *MacConkey Agar* o altro terreno selettivo-differenziale per Enterobacterales e Bacilli Gram Negativi non fermentanti il glucosio;

(3) *Agar* sangue (5%, di montone) con colistina ed acido nalidixico (CNA) con optochina (dischetto);

(4) *Agar* cioccolato con bacitracina (nel terreno o dischetto) o TSA+BVX;

(5) *Sabouraud Dextrose Agar* con Cloramfenicolo e/o Gentamicina.

B. Semina:

(1) agitare il campione senza centrifugare (salvo che per colture mirate per *Legionella* spp. e miceti filamentosi e per l'allestimento di preparati per *P. jirovecii*) né citocentrifugare;

(2) seminare sulle piastre in modo da rendere agevole la conta delle colonie:

(a) per lavaggio bronco-alveolare, (1 mL di materiale in 9 mL di soluzione di lavaggio —>fattore di diluizione 1/10) seminare 10 µL. Per ottenere colonie isolate può essere utile seminare su Agar sangue anche 1 µL; in tal caso la conta delle colonie sotto riportata dovrà essere moltiplicata x10.

(b) per lavaggio bronco-alveolare mirato con cateterino, seminare 100 µL. Per ottenere colonie isolate può essere utile seminare su Agar sangue anche 10 µL; in tal caso la conta delle colonie soprariportata dovrà essere moltiplicata x 10.

(c) per spazzola endobronchiale protetta, (raccoglie 0.01-0.001 mL di materiale, immerso in 1 mL fattore di diluizione 1/100-1/1000) seminare 100 µL. Per ottenere colonie isolate può essere utile seminare anche 10 µL su Agar sangue: in tal caso la conta delle colonie soprariportata dovrà essere moltiplicata x 10.

C. Incubazione:

(1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 24 ore: *Mac Conkey Agar*, *Agar* sangue e *Agar* CNA;

(2) incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) per 24 ore: *Agar* cioccolato;

(2) esaminare le piastre sopra menzionate dopo 24 ore e procedere ad identificazioni e/o isolamenti;

(4) incubare a 35°C in atmosfera aerobia per 48 ore: *Sabouraud Dextrose Agar* con antibiotici;

(5) re-incubare, in caso di negatività, le piastre di *Mac Conkey Agar*, *Agar* sangue, *Agar* CNA e di *Agar* cioccolato, e riesaminarle quotidianamente per altre 48 ore;

(6) re-incubare le piastre di *Agar Sabouraud Dextrose* con antibiotici in atmosfera aerobia a 30°C e riesaminarle dopo altri 5 giorni.

D. Quantificazione della crescita:

(1) per lavaggio bronco-alveolare: leggere la carica come segue:

N° colonie per piastra	Conta totale	
< 10	< $1x10^3$	UFC/mL
10-100	10^3-10^4	UFC/mL
100-1.000	10^4-10^5	UFC/mL
> 1.000	> 10^5	UFC/ml

(2) per lavaggio bronco-alveolare mirato con cateterino e per spazzola endobronchiale protetta: leggere la carica come segue:

N° colonie per piastra	Conta totale	
< 10	< $1x10^2$	UFC/mL
10-100	10^2-10^3	UFC/mL
100-1.000	10^3-10^4	UFC/mL
> 1.000	> 10^4	UFC/mL

4.5 Interpretazione dei risultati

(1) identificare tutti i microorganismi;

(2) se il prelievo è correttamente eseguito la carica microbica della popolazione residente nell'orofaringe è < 10^4; la carica microbica dei patogeni è di solito ≥ 10^6 (un *cut off* per la flora patogena di 10^5 sembra più appropriato, così da includere anche le infezioni in trattamento antibiotico e i quadri clinici iniziali).
Interpretare i risultati della coltura dei materiali raccolti con metodiche protette come segue:

(a) per la spazzola endobronchiale la carica critica è indicata in >10^3 UFC/mL;

(b) per il lavaggio broncoalveolare la carica critica è indicata in >10^4 UFC/mL;

(c) per il lavaggio broncoalveolare mirato con cateterino la carica critica è indicata in >10^3 UFC/mL (tale valore è stato desunto dalla comparazione con la coltura di frustoli bioptici di tessuto polmonare di 1 mm^3); in caso di terapia chemio-antibiotica, pregressa in atto, anche cariche batteriche ≤10^2 possono essere significative. Alcuni Centri effettuano la raccolta del materiale da lavaggio bronco-alveolare mirato con cateterino e palloncino (Pro-BAL): in tal caso è necessario interpretare i risultati scalando di un logaritmo.

4.6. Refertazione dei risultati

Nel referto definitivo devono essere riportati:
- i risultati dell'esame microscopico;
- il/i germe/i identificato;
- l'eventuale antibiogramma;
- eventuali commenti del microbiologo. Ad esempio:

(1) in caso di positività per batteri → "Il riscontro in coltura dei microrganismi identificati è suggestivo dell'eziologia responsabile del quadro clinico. Si consiglia di procedere all'interpretazione del dato colturale su base clinica per le valutazioni circa la necessità/tipo di approccio terapeutico, di confrontare tale dato con quello dell'esame microscopico diretto e di confermare il risultato inviando complessivamente tre *set* di emocolture per la conferma colturale"
(2) in caso di positività per *Aspergillus* spp. → "Il riscontro in coltura di *Aspergillus* spp. non è di per sé indicativa di un quadro di aspergillosi polmonare. Tale riscontro va inquadrato come possibilmente significativo nell'ambito di specifiche categorie di pazienti a rischio e in associazione a quadri radiologico-clinici indicativi. Si consigliano l'Inquadramento clinico specialistico del paziente per valutazione terapeutica, l'invio di almeno tre campioni respiratori, in giorni successivi, per la conferma colturale e di ulteriori campioni in base al sospetto clinico (per esempio, in caso di paziente con sospetta aspergillosi invasiva, di un campione di siero e di BAL per la rilevazione dell'antigene galattomannano";
(3) in tutti i casi → "Si consiglia di valutare, in base agli eventuali riscontri dell'anamnesi epidemiologica, l'opportunità di predisporre accertamenti colturali o sierologici per il riscontro di patogeni mirati".

5. Materiali bioptici

(Aspirato polmonare con ago fine; Biopsia transbronchiale; Agobiopsia polmonare; Biopsia polmonare a cielo aperto; Biopsia pleurica)

5.1 Premessa

Sui materiali di origine bioptica, la valutazione preliminare della qualità non è richiesta. In caso di colture di materiale polmonare bioptico è possibile incrementare la significatività della coltura mimando *in vitro* le condizioni fisiologiche (35°C, 6% O_2 -10% CO_2).

5.2 Pretrattamento del campione

(1) omogeneizzare il materiale in brodo triptosio in rapporto 1:10 (es. 0,5 g di tessuto in 5 mL di brodo) con omogeneizzatore di tessuti *disposable* o sterilizzabile.

5.3 Esame microscopico

(1) deporre il materiale su vetrino:
- per apposizione su vetrini sterili, utilizzabile per pochi vetrini, oppure
- striscio dall'omogeneizzato, utilizzabile per molte colorazioni;

(2) procedere come indicato per i materiali a basso rischio di contaminazione con saliva.

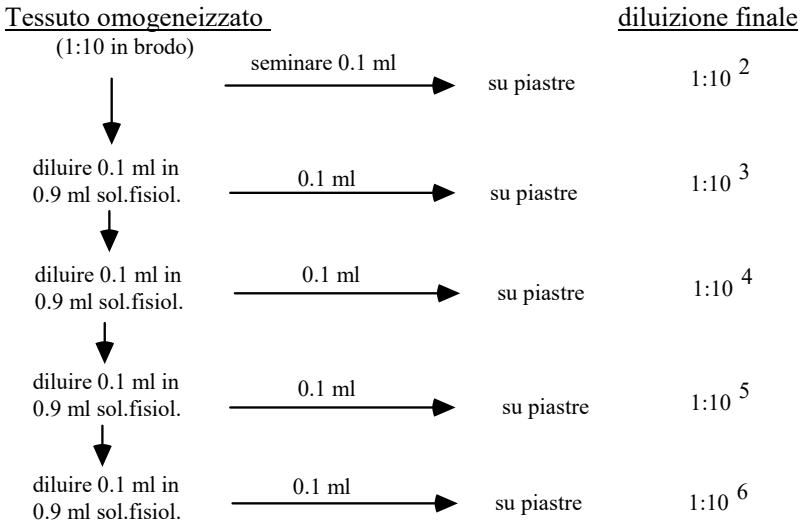
5.4 Esame colturale

A. Terreni:

(1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);
(2) *MacConkey Agar* o altro terreno selettivo-differenziale per *Enterobacteriaceae* e Bacilli Gram Negativi non fermentanti il glucosio;
(3) *Agar* sangue (5%, di montone) con colistina ed acido nalidixico (CNA) con optochina (dischetto);
(4) *Agar* cioccolato con bacitracina (nel terreno o dischetto) o TSA+BVX;
(5) *Sabouraud Dextrose Agar* con cloramfenicolo e/o Gentamicina;
(6) brodo tioglicolato.

B. Semina:

- agitare il campione (*vortex* 30-60 secondi)
- seminare secondo lo schema sotto riportato (si sconsiglia l'uso dell'ansa calibrata)



C. Incubazione:

(1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 24 ore: *MacConkey Agar*, *Agar* sangue, *Agar* CNA e *Sabouraud Dextrose Agar* con antibiotici;
(2) incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) per 24 ore: *Agar* cioccolato;
(3) esaminare le piastre sopra menzionate dopo 24 ore e procedere ad identificazioni e/o isolamenti;
(4) re-incubare, in caso di negatività, le piastre di *MacConkey Agar*, *Agar* sangue, *Agar* CNA e di *Agar* cioccolato, e riesaminarle quotidianamente per altre 48 ore;
(5) re-incubare le piastre di *Agar Sabouraud Dextrose* con antibiotici in atmosfera aerobia a 30°C e riesaminarle dopo altri 5 giorni;
(6) re-incubare il flacone di brodo tioglicollato in atmosfera aerobia a 35°C e riesaminarlo quotidianamente per altri 5 giorni.

5.5 Interpretazione dei risultati

(1) identificare e refertare tutti i microrganismi;
(2) interpretare l'arricchimento (brodo tioglicollato) come segue:
- se il brodo rimane limpido dopo 5 giorni di incubazione: scartare come negativo.
- se il brodo diventa torbido: effettuare colorazione di Gram.

  Se il morfotipo apprezzato all'esame batterioscopico del brodo concorda con i risultati della crescita in piastra, non procedere a sottocolture. In caso di mancata concordanza, procedere a sottocolture utilizzando terreni idonei (anche per anaerobi) e poi identificare.

(3) commentare l'eventuale presenza di flora normale orofaringea con la nota: "Possibile contaminazione durante la raccolta. Si consiglia di valutare il risultato microbiologico alla luce dei dati clinici."

6. Ricerche particolari

Con l'esame colturale si effettuano sempre le ricerche "*di routine*" precedentemente segnalate.

Ricerche particolari che richiedono l'utilizzo di terreni supplementari e/o di tecniche particolari necessarie per l'evidenziazione (diretta o colturale) del microrganismo in questione sono eseguite solo nel caso di specifica indicazione. La decisione di allargare lo spettro delle ricerche

è solo in parte responsabilità del microbiologo. I procedimenti sotto riportati si riferiscono a procedure minime di primo trattamento, comprensivo della semina e dell'incubazione. Laddove non fosse possibile l'effettuazione delle prove sottoindicate, è opportuno appoggiarsi ad altro Laboratorio. Per le procedure minime di identificazione si rimanda alle procedure operative *standard* in uso in laboratorio.

Si riportano anche, in sintesi, le indagini effettuabili con tecniche sierologiche o di biologia molecolare.

1. *Anaerobi*
   - A. Indicazione
     - (1) sospetta polmonite *ab ingestis* (anamnesi positiva per contaminazione con materiale alimentare o proveniente dall'apparato digerente)
     - (2) sospetta polmonite in soggetti di età geriatrica.
   - B. Terreni:
     - (1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone) arricchito per anaerobi:
     - (2) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone) selettivo, arricchito per anaerobi [PEA, feniletil alcool, o KV (kanamicina-vancomicina)];
   - C. Incubazione:
     - (1) incubare a 35-37°C in atmosfera anaerobia per 48 ore
   - D. Criteri di base per l'identificazione
     - (1) prova di aerotolleranza (semina su Agar sangue in anaerobiosi ed in CO_2);
     - (2) identificazione con dischetti o *kit* commerciali (localmente o c/o Centri di riferimento);
     - (3) in caso di positività, utilizzare la nota: "Il riscontro di batteri anaerobi deve essere valutato alla luce del quadro clinico e della possibilità di contaminazione con materiale di origine digestiva".

2. *Bacillus anthracis*
   - A. Indicazione
     - (1) sospetto carbonchio (anamnesi positiva per viaggio in regione endemica o con epidemia nota;
     - (2) sospetta azione di bioterrorismo.
   - B. Terreni:
     - (1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone).
   - C. Incubazione:
     - (1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 48 ore.
   - D. Criteri di base per l'identificazione
     - (1) colorazione di Gram o Blu di metilene
     - (2) *test* della mobilità
     - (3) *test* della produzione della capsula

3. *Bordetella pertussis*
   - A. Indicazione
     - (1) sospetta pertosse.
   - B. Terreni:
     - (1) *Agar* Bordet Gengou;
   - C. Incubazione:
     - (1) incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) per 7 giorni;
   - D. Criteri di base per l'identificazione
     - (1) identificare per qualunque carica microbica;
     - (2) catalasi;
     - (3) ureasi.

4. *Burkholderia cepacia*
   - A. Indicazione
     - (1) sospetta infezione in soggetti con anamnesi positiva per fibrosi cistica
   - B. Terreni:
     - (1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);
     - (2) *Agar* selettivo per *Burkholderia cepacia* (quali: BCSA, OFPBL, PCA);

C. Incubazione:
   (1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 5 giorni
D. Criteri di base per l'identificazione
   (1) ossidasi;
   (2) *kit* commerciali per identificazione di *Burkholderia cepacia complex*;
   (3) conferma da Centro di referenza per la definizione biomolecolare del genomovar;
   (4) antibiogramma

5. *Burkholderia pseudomallei*
A. Indicazione
   (1) sospetto melioidosi (anamnesi positiva per viaggio in regione endemica o con epidemia nota;
   (2) sospetta azione di bioterrorismo;
B. Terreni:
   (1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);
C. Incubazione:
   (1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 48 ore;
D. Criteri di base per l'identificazione
   (1) identificare per qualunque carica microbica;
   (2) ossidasi;
   (3) *kit* commerciali per identificazione;
   (4) conferma da Centro di referenza per la diagnosi di specie;
   (5) antibiogramma.

6. *Legionella* spp.
A. Indicazione
   (1) legionellosi accertata per la rilevazione dell'antigene urinario;
B. Terreni:
   (1) *Agar Buffered Charcoal Yeast Extract* (BCYE);
   (2) GVPC;
C. Incubazione:
   (1) incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) per 48 ore;
   (2) re-incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) fino a 14 giorni;
D. Criteri di base per l'identificazione
   (1) identificare per qualunque carica microbica;
   (2) crescita su BCYE;
   (3) agglutinazione su vetrino (localmente o c/o Centri di riferimento) per la rilevazione del sierogruppo;
   (4) non si esegue antibiogramma.
E. Ricerca anticorpi:
   (1) procedere alla conservazione del siero 'di fase acuta';
   (2) segnalare al Curante che il siero 'di fase acuta' sarà processato contestualmente al campione 'di fase convalescente', utilizzando la nota: "Si comunica che la determinazione degli anticorpi anti-*Legionella* sul campione 'in fase acuta' pervenuto in data odierna sarà effettuata contestualmente al secondo siero, che dovrà essere prelevato tra 3-5 settimane (in fase convalescente). Il siero è conservato nella sieroteca del laboratorio";
   (3) processare in un'unica seduta i sieri 'di fase acuta' e 'di fase convalescente'.

7.Miceti dimorfi (*Blastomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Histoplasma* spp, *Paracoccidioides* spp.)

A. **Indicazione:**
   (1) riservare ai casi di sospetto clinico o epidemiologico (soggiorno in area di endemia o epidemia nota).
B. **Terreni:**
   (1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone) ed *agar* Sabouraud;
C. **Incubazione:**
   (1) incubare a temperatura ambiente ed a 35-37°C in atmosfera aerobia per 30 giorni;
D. **Criteri di base per l'identificazione**
   (1) identificare per qualunque carica microbica;
   (2) esame macroscopico, previa inversione di fase;
   (3) esame microscopico, previa inversione di fase;

8. *Nocardia* spp.

A. **Indicazione:**
   (1) riservare ai casi di sospetto clinico, radiologico o epidemiologico;
B. **Terreni:**
   (1) *Agar* BCYE;
   (2) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);
C. **Incubazione:**
   (1) incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) per 48 ore: BCYE;
   (2) re-incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO_2 (5-10%) fino a 14 giorni: BCYE;
   (3) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia: *Agar* sangue.
D. **Criteri di base per l'identificazione**
   (1) identificare per qualunque carica microbica;
   (2) crescita su terreni al sangue con colonie caratteristiche;
   (3) colorazione di Kinyoun modificata;
   (4) conferma da Centro di referenza per la diagnosi di specie;
   (5) antibiogramma (sec Kirby Bauer e MIC in *agar* diffusione).

9. *Pasteurella multocida*

A. **Indicazione:**
   (1) riservare ai casi di sospetto clinico, radiologico o epidemiologico (etilismo, tabagismo, bronchiectasie, neoplasie polmonari e contatto con suini);
B. **Terreni:**
   (1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);
C. **Incubazione:**
   (1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 48 ore;

10. *Pneumocystis jirovecii*

A. **Indicazione:**
   (1) riservare ai casi di sospetto clinico, radiologico o epidemiologico (immunodepressione);
B. **Criteri diagnostici**
   (1) impregnazione argentica, immunofluorescenza o biologia molecolare;
   (2) se (1) positivo: confermare con altro metodo.

11. *Rhodococcus equi*

A. **Indicazione:**
   (1) riservare ai casi di sospetto clinico, radiologico o epidemiologico (immunodepressione; contatto con equini);
B. **Terreni:**
   (1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone);
C. **Incubazione:**
   (1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 48 ore;
D. **Criteri di base per l'identificazione**
   (1) identificare per qualunque carica microbica;
   (2) crescita su terreni al sangue con colonie caratteristiche;

(3) catalasi;
(4) *kit* commerciali per identificazione;
(5) conferma da altro Centro;
(5) antibiogramma.

12. *Yersinia pestis*

A. **Indicazione:**
(1) riservare ai casi di sospetto clinico o epidemiologico (soggiorno in area di endemia o epidemia nota).

B. **Terreni:**
(1) *Agar* sangue (5%, di cavallo o di montone)

C. **Incubazione:**
(1) incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 48 ore (colonie puntiformi in *Agar* sangue dopo 24 ore)

D. **Criteri di base per l'identificazione**:
(1) identificare per qualunque carica microbica;
(2) ossidasi;
(3) *Kit* commerciali per identificazione;
(4) conferma da Centro di referenza per la diagnosi di specie;
(5) antibiogramma

Allegato 4

INDICATORI PER IL PERCORSO DIAGNOSTICO DELLE POLMONITI

L'indicatore è una misura che si trasforma in indicatore quando si riferisce ad un problema ed è inserito in un processo decisionale.

Esistono indicatori di:

- *outcome* o esito → misurano ciò che accade/non accade come effetto di un processo.
- processo → misurano un'azione fatta direttamente o indirettamente nell'ambito di un trattamento.

INDICATORI DI ESITO IN POLMONITE ACQUISITA IN COMUNITÀ

- Tasso di ospedalizzazione globale;
- Tasso di ospedalizzazione pz >65 anni;
- Tasso ospedalizzazione in ICU;
- Tasso di mortalità
- Tasso di CAP a lenta risoluzione.

INDICATORI DI PROCESSO

- Indice di appropriatezza dell'approccio terapeutico;
- Somministrazione della terapia entro 6h dalla diagnosi;
- Antibiotico appropriato;
- Tempo di attesa tra richiesta esame e risposte in reparto (lo *standard* è il 90% entro le 48h)
- Tasso di CAP per agente patogeno;
- % di urine positive per ricerca Ag *Legionella* e pneumococco;
- Tasso di pazienti con eventi avversi durante il ricovero;
- Tasso di mortalità (sesso, età);
- Tasso di infezione (sesso, età).

Il calcolo degli indicatori può avvenire come:

- proporzione: N. pz in rianimazione in antibioticoterapia entro 6 ore/n° pazienti in Terapia Intensiva.
- rapporto: il numeratore non è un sottoinsieme del denominatore ma c'è relazione fra i due: Pz sottoposto a Ventilazione/giorni di Ventilazione
- variabile continua: media aritmetica: Degenza media per pazienti con Ventilazione: Giorni per paziente in VAM/paziente in VAM.

ESEMPI:

INDICATORI	STANDARD	TEMPI MONITORAGGIO
N. POLMONITI/TOTALE PZ IN VAM	<10%-20% pazienti in VAM (Ministero della Salute)	annuale
N. POLMONITI POST-OPERATORIE	<1.5%-2% pazienti (Ministero della Salute)	annuale

Lo *standard* rappresenta il dato di riferimento empirico o da dati scientifici che rendono appropriato il valore del nostro indicatore. Gli indicatori devono essere personalizzati all'interno del singolo ospedale in modo da migliorare l'efficacia del proprio percorso residenziale.