

## Practical tips nella diagnostica equina: broncho alveolar lavage (BAL) e tracheal wash (TW)

La diagnostica di laboratorio dell'apparato respiratorio nella specie equina presenta notevoli difficoltà, dovute principalmente alle caratteristiche fisiche di questo animale: le notevoli dimensioni infatti non rendono agevole il prelievo di campioni idonei per accertamenti diagnostici (tamponi, biopsie, citologie, analisi di secrezioni).

Per l'apparato respiratorio possiamo effettuare una corretta citologia e batteriologia di tutto l'albero bronchiale tramite broncho alveolar lavage (BAL) e tracheal wash (TW).

Vediamo in primis come raccogliere il materiale idoneo per ogni tipologia di esame e come gestirlo per farlo arrivare nel migliore dei modi al laboratorio.

Per entrambe le metodiche di raccolta bisogna aspettare almeno qualche ora dopo il trasporto o in seguito ad esercizio sportivo del soggetto, in quanto queste attività potrebbero aumentare in modo spurio la presenza di cellule infiammatorie polmonari.

### BRONCHO ALVEOLAR LAVAGE (BAL)

Questo esame permette di esaminare le parti più profonde del tratto respiratorio per una diagnosi precisa di patologie infiammatorie, allergiche o neoplastiche. La **batteriologia** del BAL invece rispecchia solamente la crescita batterica delle vie profonde.

I campioni per la **citologia** appaiono maggiormente diagnostici, con una cellularità più definita e meno contaminazioni da materiale estraneo, come facilmente succede

prendendo in esame le prime vie. Esistono due metodiche utilizzabili:

> **metodica endoscopica:** presenta il vantaggio di avere il controllo visivo dell'albero bronchiale, per selezionare le zone più indicative per effettuare i prelievi (dove abbiamo presenza di neoformazioni, lesioni patologiche, pus, muco e sangue). Si possono infatti effettuare prelievi - con apposite pinze e cateteri veicolati dallo stesso endoscopio - di pezzi istologici e materiale vario da sottoporre ad analisi, oltre che immettere piccole quantità di soluzione fisiologica da riaspirare dopo pochi istanti effettuando quindi un lavaggio dell'area prescelta per poi sottoporre il liquido ad esame batteriologico e citologico, con metodica detta appunto "lavaggio bronco-alveolare".

Questa metodica permette di ottenere dei campioni cito / istologici maggiormente attendibili perché meno deteriorati rispetto ai corrispondenti campioni delle vie aeree superiori.

### Esecuzione:

- idonea sedazione e contenimento per evitare tosse e scuotimenti all'inserimento dell'endoscopio (situazione che condiziona pesantemente la qualità del materiale raccolto).

- preparare l'attrezzatura pulendo e disinfettando il canale biottico, le pinze od il catetere; risciacquare poi con fisiologica sterile

- inserire l'endoscopio: è possibile iniettare 20-30 ml di lidocaina nel canale di lavoro una

volta in trachea per limitare il riflesso della tosse

- una volta raggiunto il bronco prescelto, si gonfia il palloncino del catetere e si iniettano altri 10 ml di lidocaina

- iniziare l'infusione di fisiologica a boli di 60 ml tramite il catetere (fino a 300 ml nel soggetto adulto, 60/100 ml nel puledro)

- recuperare il fluido scegliendo le zone maggiormente indicative di patologie, controllando macroscopicamente che ci sia della schiuma e del muco, indice di corretto campionamento polmonare

> metodica con solo catetere, cosiddetta "cieca": si effettua con l'ausilio di un apposito catetere cuffiato per BAL che può essere sterilizzato in autoclave dopo ogni utilizzo. Presenta lo svantaggio di non poter controllare visivamente dove si va a localizzare la punta del catetere e quindi in ultima analisi non risulta possibile selezionare la zona più adatta per effettuare i prelievi, però è la metodica più rapida e meno indaginosa quindi potrebbe essere indicata in animali molto dispnoici o che mal tollererebbero una sedazione prolungata usata per l'esame endoscopico.

#### **Esecuzione:**

- preparare l'animale come per l'esame endoscopico

- si inserisce il catetere alla cieca, fino a quando si blocca una volta arrivato alla fine del bronco (pare si localizzi con maggior facilità nel polmone dorsale destro)

- si gonfia il palloncino e si inietta la soluzione fisiologica

- si recupera il materiale liquido di lavaggio, applicando una costante pressione negativa con l'ausilio di una siringa da 60 ml.

## **TRACHEAL WASH**

Si tratta della tecnica di recupero di secrezioni e cellule della parte distale della trachea e polmoni, possibile tramite endoscopia ma anche con metodica "cieca", utilizzando un catetere o ago con punzione di un anello tracheale prossimale. Sono disponibili anche degli appositi kit con tutto il necessario per l'esecuzione di questa procedura.

La batteriologia di questo distretto rispecchia la situazione di tutto l'albero tracheo bronchiale, non solo delle basse vie, e la metodica transcutanea è meno esposta alle contaminazioni da parte di batteri opportunisti delle vie aeree superiori.

La qualità del materiale da sottoporre a citologia appare generalmente minore rispetto al BAL, a causa sia della metodica stessa che dell'estrema varietà della popolazione cellulare presente, unitamente alla presenza di secrezioni di varia origine che rendono il campione meno indicativo.

> **Metodica transcutanea:** dopo adeguato contenimento, bisogna tosare e disinfettare un'area di circa 10 cm sulla linea mediana centrale della trachea. Una volta individuato il sito di puntura tra un anello e l'altro è possibile effettuare un'infiltrazione di lidocaina e, con guanti sterili, si opera una piccola incisione attraverso cui far passare il catetere – direzionandolo verso il basso, cercando di evitare la tosse - per il lavaggio. L'operazione si effettua con l'ausilio di una siringa da 60 ml e con soluzione fisiologica sterile, iniettando rapidamente 20–30 ml di soluzione salina e recuperandola poco dopo, avendo cura di applicare piuttosto rapidamente una pressione negativa costante.

Se necessario si possono iniettare più boli consecutivamente, avendo cura di non superare i 100 ml totali, ricordando che

ovviamente una certa quantità si perde nelle vie aeree. Alla fine della procedura si rimuove lentamente il catetere con l'ago, avendo cura di pulire e disinfettare bene la ferita cutanea.

Con questa metodica sono possibili rare complicanze come:

- infezioni ed ascessi nel punto di inoculo
- perdita del catetere nell'albero bronchiale (di solito eliminato naturalmente con la tosse)
- lieve enfisema sottocutaneo (soprattutto con soggetti molto dispnoici)
- condrite e stenosi in corrispondenza dell'anello tracheale sede di puntura.

> **Metodica endoscopica:** esecuzione come per il BAL, solo che ci si posiziona con lo strumento all'inizio della trachea e non in corrispondenza dei bronchi. Con questa metodica sono possibili contaminazioni batteriche dalle vie aeree superiori durante il passaggio dell'endoscopio nelle stesse o nel caso in cui non si riesca a controllare efficacemente il riflesso della tosse.

## GESTIONE DEI CAMPIONI

Vediamo ora come raccogliere ed inviare i campioni ottenuti al laboratorio, massimizzando in questo modo le possibilità diagnostiche.

**Batteriologia:** è possibile preparare un tampone con medium direttamente con il materiale raccolto o dopo averlo deposto in una provetta sterile da siero oppure, in alternativa, immettere alcuni ml di fluido in una bottiglia per emocoltura, dalla quale verrà allestita la piastra. Possiamo anche effettuare un esame batteriologico direttamente dal liquido presente nella provetta al momento dell'arrivo al laboratorio, però potremmo non

ottenere un risultato attendibile della crescita batterica, che dovrebbe rispecchiare nell'insieme la popolazione presente al momento del prelievo. Questo vale soprattutto per campioni con presenza di detriti ed emazie, considerando i tempi per la consegna dei campioni al laboratorio e le temperature esterne non sempre favorevoli. La crescita di batteri opportunisti potrebbe danneggiare anche la popolazione cellulare presente nel fluido, si consiglia pertanto la spedizione in temperatura controllata per tutti i campioni.

Ricordiamo inoltre che su questo materiale possiamo eseguire le **PCR** per la ricerca di agenti virali e batterici.

**Citologia:** anche per questo tipo di campioni sono possibili due metodiche di preparazione.

> Lasciare sedimentare o centrifugare il liquido a 500 giri/sec per 5 minuti, eliminare il surnatante e strisciare il fondo ottenuto (dopo averlo agitato ricreando la sospensione in una piccolissima quantità di liquido residuo) su un vetrino, grazie all'utilizzo di un citobrush, facendolo rotolare e senza premere eccessivamente.

Far poi asciugare il campione - il più rapidamente possibile - con l'ausilio di una fonte di aria calda proveniente da sotto al vetro, per non danneggiare il materiale strisciato. Una volta fissate le cellule con questa modalità, le stesse potranno essere colorate dal laboratorio in un secondo momento, secondo le necessità diagnostiche. Non è pertanto necessario utilizzare fissativi o colorazioni rapide.

> Immettere il liquido in una provetta EDTA, evitando così la formazione di aggregati cellulari ed artefatti. Spedire tutto il liquido che verrà poi centrifugato, strisciato, allestito e colorato in laboratorio.

Nel primo caso possiamo spedire i campioni anche il giorno dopo perché appunto le cellule sono ormai fissate, mentre nel secondo caso si raccomanda l'invio al laboratorio entro le 24 ore.

**Istologia:** per questo tipo di campioni è obbligatorio l'uso di contenitori dedicati, con apposito secondo contenitore protettivo (forniti gratuitamente da Laboklin), in quanto la fuoriuscita accidentale di formalina e materiale biologico per apertura o rottura dei contenitori stessi espone il personale a rischio biologico. Ciò potrebbe comportare gravose multe per il laboratorio con inoltre distruzione obbligatoria del tessuto inviato in modo non appropriato.

Questi campioni vengono conservati per molto tempo. Se la situazione clinica suggerisce l'esigenza di ulteriori approfondimenti chiedete sempre al laboratorio prima di inviare altro materiale.

I campioni istologici vengono prelevati tramite apposite pinze endoscopiche dopo identificazione visiva della neoformazione e/o lesione da analizzare.

### **Evidenziamo le novità del nuovo listino Laboklin 2019-20**

#### **Batteriologia:**

- vengono conteggiati come esame singolo fino a 2 tamponi provenienti da uno stesso distretto od organo, quando finalizzati ad una singola diagnosi

- i campioni al loro arrivo vengono immessi in uno speciale brodo di coltura accelerante per abbreviare i tempi di crescita delle colonie

- con metodica MALDI-TOF viene prontamente identificato il germe isolato, ovvero una PCR con mappatura genomica del microrganismo

- viene eseguito l'antibiogramma delle specie patogene riscontrate con la tecnica della microdiluzione, secondo le più moderne linee guida di lotta all'antibiotico-resistenza.

#### **Citologia:**

- vengono conteggiati come esame citologico singolo fino a 4 vetrini da una singola localizzazione, fino a 3 se da due localizzazioni (quindi 6 vetrini in totale)

- se si inviano invece più di 4 vetrini per singola localizzazione, oppure più di 6 da due localizzazioni, il prezzo aumenta lievemente

- se si inviano invece vetrini da più di 2 localizzazioni, il prezzo è il medesimo qui sopra aumentato, indipendentemente dal numero di vetrini totali

- possiamo effettuare una diagnostica citologica da immagini digitali

#### **Istopatologia:**

- il prezzo è singolo anche per biopsie multiorgano, fino a 3 pezzi istologici, finalizzate ad una sola diagnosi per un medesimo paziente.

Si cerca in questo modo di agevolare al massimo il veterinario clinico nel raggiungimento di una diagnostica quanto più rapida ed efficace possibile.