



GRANDE OSPEDALE METROPOLITANO
BIANCHI MELACRINO MORELLI
REGGIO CALABRIA



XLVII Congresso Nazionale AMCLI



10-13 Novembre 2018 – Palacongressi di Rimini

Microbiologia Forense

(post-mortem)

stato dell'arte per una nuova disciplina

dr. Francesco d'Aleo

Conflict of interest:

The Authors declare that they have no conflict of interests.



Lezione di anatomia del dottor Tulp
Rembrandt Olio su tela, 1632

Definizione

«La **Microbiologia Post-Mortem** rappresenta un importantissimo strumento nelle mani del microbiologo-clinico in riferimento ad indagini di natura forense dove è necessario stabilire se un determinato microrganismo può aver contribuito o determinato la morte di un soggetto»

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2015) 34:1045–1057
DOI 10.1007/s10096-015-2317-x

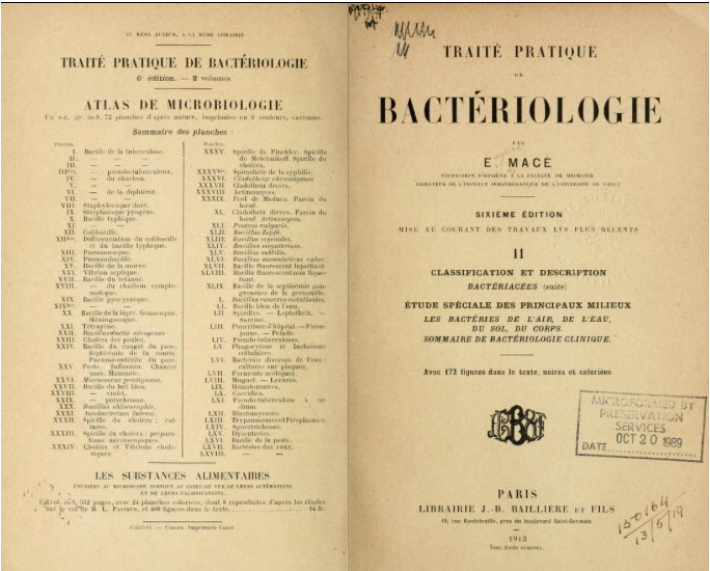
ARTICLE

How to optimise the yield of forensic and clinical post-mortem microbiology with an adequate sampling: a proposal for standardisation

2015

A. Fernández-Rodríguez • M. C. Cohen • J. Lucena •
W. Van de Voorde • A. Angelini • N. Ziyade • V. Saegeman

1895



Achard C, Phulpin E.
L'envahissement des organes par les microbes pendant l' agonie et après la mort.
Arch Med Exp, 7 (1895)

1965

Arch Pathol. 1965 Nov;80(5):540-7.

Studies of postmortem microbiology using sterile autopsy technique.

O'Toole WF, Saxena HM, Golden A, Ritts RE.



1968

THE AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY
Copyright © 1968 by The Williams & Wilkins Co.

Vol. 49, No. 3
Printed in U.S.A.

POSTMORTEM BACTERIOLOGY

A PRACTICAL METHOD FOR ROUTINE USE

DAVID S. DE JONGH, M.D., JOHN W. LOFTIS, M.D., G. SHELDON GREEN, M.D.,
JOHN A. SHIVELY, M.D., AND TATE M. MINCKLER, M.D.
*Departments of Experimental Pathology, Biomathematics, and Pathology, The University of Texas
M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute, Houston, Texas 77025*

Due principali teorie erano chiamate in causa per spiegare la presenza di batteri nei tessuti cadaverici:

- **La disseminazione agonica**

Bacteremias in the agonal period
JW Fredette
180-92, Fredette JW. Bacteremias in the agonal period. J Lab Clin Med 1916;2:180-92., 1916

concetto introdotto da *J.V. Fredette nel 1916* e consisterebbe nella disseminazione passiva dei microrganismi all'interno del sangue, durante lo stato agonico (il fine vita) o durante le manovre rianimatorie.

Nel suo studio Fredette riporta 119 casi nei quali il campionamento di sangue era avvenuto **entro 30 min** dalla morte.

- **La migrazione transmortale**

Bacteriological autopsy II. Comparison of a group of cancer patients with a control group
KNUD ERIK LARSEN, PER SØGAARD, LINE BUHL, HANNE ELISABETH LOU, ULRİK HENRIQUES

concetto introdotto da *Gradwohl nel 1904*, per cui i batteri migrano attivamente attraverso le barriere mucose all'interno del sangue, quando la circolazione è già cessata.

Questo concetto è ripreso da *Larsen nel 1991* che lo riduce all'eccessiva manipolazione del cadavere e degli organi durante le fasi autoptiche.

Larsen K. prende in considerazione tre diverse possibilità in caso di isolamento di microrganismi da campioni autoptici:

- organismi responsabili di vere infezioni che possono o meno aver causato o concausato la morte del soggetto
- organismi che si sono moltiplicati durante il periodo agonico
- organismi che sono migrati dal tratto intestinale, respiratorio o urogenitale-urinario

Sunugawa K. aggiunge una quarta possibilità, che necessita di essere tenuta in conto:

- la contaminazione al momento del prelievo

1991

Bacteriological autopsy II. Comparison of a group of cancer patients with a control group

KNUD ERIK LARSEN, PER SØGAARD, LINE BUHL, HANNE ELISABETH LOU, ULRİK HENRIQUES

Bacteriological autopsy I. A methodological study

P. SØGAARD, K. E. LARSEN, L. BUHL, H. E. LOU, U. HENRIQUES

2017

Post-mortem detection of bacteremia using pairs of blood culture samples

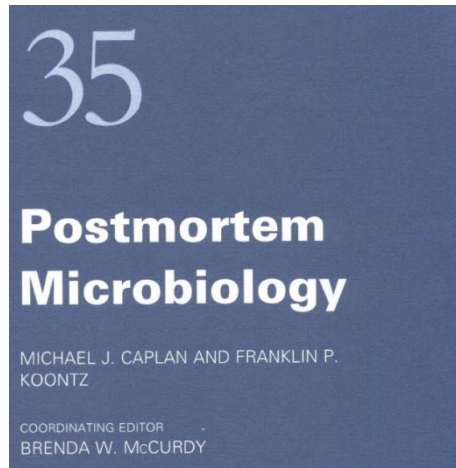
Keishin Sunagawa*, Masahiko Sugitani



2001



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY



Postmortem Microbiology

Michael J. Caplan

State of Delaware Office of the Chief Medical Examiner,
Wilmington, Delaware 19801

Franklin P. Koontz

Department of Pathology, University of Iowa Hospitals,
Iowa City, Iowa 52242

COORDINATING EDITOR: Brenda W. McCurdy

Department of Pathology and Laboratory Medicine, VA Medical Center,
Detroit, MI 48201

TRE POSSIBILI SCENARI PER L'UTILIZZO DELLE INDAGINI DI PMM

1 – confermare la presenza di un'infezione sospettata clinicamente ma non provata ante-mortem.

2 – identificare in un'infezione la causa di una morte improvvisa.

3 – valutare l'efficacia della terapia antibiotica nell'eradicare l'infezione.

2014



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Journal of
Clinical Microbiology®

The Value of Postmortem Microbiology Cultures

Stefan Riedel

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2015) 34:1045–1057
DOI 10.1007/s10096-015-2317-x

2015

ARTICLE

How to optimise the yield of forensic and clinical post-mortem microbiology with an adequate sampling: a proposal for standardisation

A. Fernández-Rodríguez • M. C. Cohen • J. Lucena •
W. Van de Voorde • A. Angelini • N. Ziyade • V. Saegeman



Morte improvvisa degli infanti

Site of sample	Quantity
Nasopharyngeal swab	Two flocked swabs
Blood (peripheral ^a or central)	3–5 ml 3–5 ml
Serum	3–5 ml total blood
Lung	>1–2 cm ³ (2 samples)
Spleen	>1–2 cm ³
Myocardium	>1–2 cm ³ (2 samples)
Bowel content (faeces)	2–3 ml
CSF (cerebrospinal fluid)	2–3 ml

Morte improvvisa 17-35 anni

Site of sample	Quantity
Blood (peripheral)	3–5 ml
Serum	3–5 ml total blood
Myocardium	>1–2 cm ³
Spleen	>1–2 cm ³

Morte inaspettata con segni clinici a qualsiasi età

Specimens	Site of sample	Quantity
Recommended specimens	Blood (peripheral ^a or central)	3–5 ml 3–5 ml 3–5 ml
	Serum	3–5 ml total blood
	Spleen	>1–2 cm ³
Complementary specimens		
Category of symptoms		
Neurological:		
Category of symptoms		
Bacterial meningitis	CSF, brain tissue Throat swab ^d	CSF: 2–3 ml; brain: >1–2 cm ³ 1 swab
Encephalitis and myelitis	CSF, brain tissue	CSF: ≥1 ml; brain: >1–2 cm ³
Human form of bovine spongiform encephalopathy	CSF Blood	≥1 ml ≥1 ml
Septicemia, septic shock Disseminated fungemia	Macroscopically abnormal organs: lung, myocardium, liver, kidney Skin petechiae biopsy ^e , adrenals ^f CSF (if fungal infection suspected)	>1–2 cm ³ of each tissue
Respiratory symptoms:	Always:	
Pneumonia and other respiratory infections: tonsillitis, epiglottitis, bronchitis, bronchiolitis, croup, flu, pertussis	-Lung (a representative sample from the lobe/s affected by pneumonia) -Nasopharyngeal & bronchial swabs -Other swabs from affected tissue Throat swabs (if tonsillitis) Pleural fluid (if empyema)	>1–2 cm ³ 2 from each site (one with each medium) 2 (one with each medium) 2 swabs (one with each medium) >1–2 ml
Food poisoning and gastroenteritis	Bowel content (faeces)	≥1 ml
Bloody faeces or hemolytic-uremic syndrome	Urine	≥1 ml
Fulminant hepatitis	Liver	>1–2 cm ³
Bacterial peritonitis	Peritoneal fluid (ascites)	≥1 ml
Endocarditis		2 swabs/ fragment



2018

Clin Microbiol Infect. 2018 Aug 24. pii: S1198-743X(18)30583-4. doi: 10.1016/j.cmi.2018.08.009. [Epub ahead of print]

Post-mortem microbiology in sudden death: sampling protocols proposed in different clinical settings.

Fernández-Rodríguez A¹, Burton JL², Andreoletti L³, Alberola J⁴, Fornes P⁵, Merino I⁶, Martínez MJ⁷, Castillo P⁸, Sampaio-Maia B⁹, Caldas IM¹⁰, Saegeman V¹¹, Cohen MC¹²; ESGFOR and the ESP.

Utilizzo del PMM in diversi scenari (sospettati):

- Mli e Mlb
- MI
- Sepsi
- Fungemie
- Infezioni respiratorie
- Morte cardiaca

Questo lavoro rappresenta il primo protocollo europeo per il campionamento microbiologico in caso di morte improvvisa.



The Living Dead: Bacterial Community Structure of a Cadaver at the Onset and End of the Bloat Stage of Decomposition

Embriette R. Hyde¹, Daniel P. Haarmann², Aaron M. Lynne², Sibyl R. Bucheli^{2*}, Joseph F. Petrosino¹

Si comincia a parlare di «**Necrobioma**» ovvero delle comunità microbiche che guidano e portano a compimento la decomposizione umana.

Per la prima volta si ipotizza che le successioni microbiche possano servire a stabilire l'intervallo post-mortale.



Applicazione della PMM nella determinazione del PMI

A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system 2013

Jessica L Metcalf^{1*}, Laura Wegener Parfrey^{1†}, Antonio Gonzalez¹, Christian L Lauber², Dan Knights^{3,4}, Gail Ackermann¹, Gregory C Humphrey¹, Matthew J Gebert¹, Will Van Treuren¹, Donna Berg-Lyons¹, Kyle Keepers¹, Yan Guo⁵, James Bullard⁶, Noah Fierer^{2,7}, David O Carter⁸, Rob Knight^{1,9,10,11*}



Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans 2014

Ismail Can ^a, Gulnaz T. Javan ^a, Alexander E. Pozhitkov ^c, Peter A. Noble ^{b,c,*}



Human Thanatomicrobiome Succession and Time Since Death

Gulnaz T. Javan¹, Sheree J. Finley², Ismail Can¹, Jeremy E. Wilkinson³, J. Delton Hanson³ & Aaron M. Tarone⁴



2016

The Thanatomicrobiome: A Missing Piece of the Microbial Puzzle of Death

Gulnaz T. Javan^{1*}, Sheree J. Finley², Zain Abidin¹ and Jennifer G. Mulle^{3,4}



2016

Human Thanatobiome Succession and Time Since Death

Gulnaz T. Javan¹, Sheree J. Finley², Ismail Can¹, Jeremy E. Wilkinson³, J. Delton Hanson³ & Aaron M. Tarone⁴



2016

Questo studio ha preso in considerazione 27 (15 uomini e 12 donne) corpi ad intervalli post-mortali differenti, compresi tra 3.5 e 240 ore. 16s rRNA è stato utilizzato per classificare i taxa microbici presenti nei diversi organi e tessuti.

Conclusioni

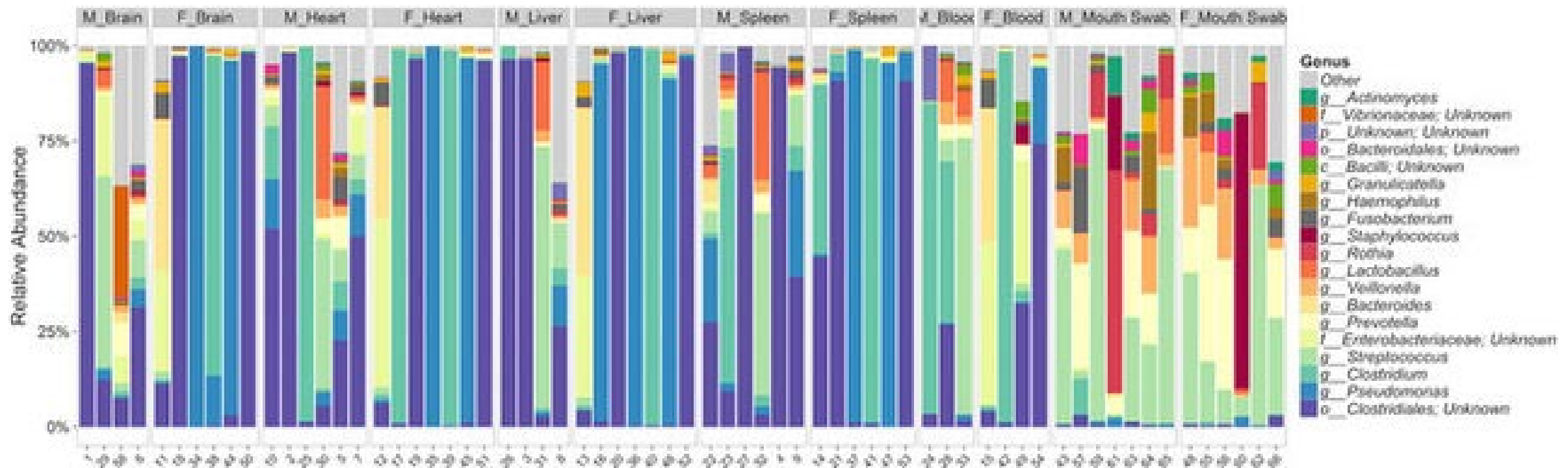
Donna/Uomo: Entrambi mantengono elevate percentuali di *Clostridiales*, solamente negli uomini è presente *Rothia* mentre solamente nelle donne è presente e abbondante *Pseudomonas*.

Gli anaerobi obbligati (*Clostridiales*) erano presenti a qualsiasi tempo di campionamento mentre gli anerobi facoltativi come i *Lactobacillus* erano abbondanti nelle prime ore dopo la morte (soprattutto negli uomini), per subire un costante decremento.

Human Thanatomicrobiome 2016

Succession and Time Since Death

Gulnaz T. Javan¹, Sheree J. Finley², Ismail Can¹, Jeremy E. Wilkinson³, J. Delton Hanson³ & Aaron M. Tarone⁴



Abbondanza relativa riferita ai 20 più comuni genere rinvenuti in tutti campioni

Applicazione della PMM nei corpi in decomposizione

Un cadavere in decomposizione è un ecosistema di batteri in fervente attività.

Dunque l'applicazione della PMM risulta ancora più complicata.

Tuttavia...



2013



Case Report

The Interest of Postmortem Bacteriology in Putrefied Bodies

Géraldine Maujean M.D. ✉, Tiphaine Guinet M.D., Laurent Fanton Ph.D., Daniel Malicier Ph.D.

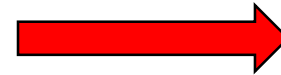
Maujean G. riporta un caso di un soggetto di 27 anni ritrovato nella propria abitazione in avanzato stato di decomposizione.

Esame esterno:

- petecchie emorragiche (?)

Esame interno:

- segni di meningite (?)
- petecchie emorragiche in zona pericardica



I campionamenti hanno riguardato:

- sangue
- urina
- LCR

Sangue: *Citrobacter freundii*LCR: *Citrobacter koserii* e *E. coli*LCR: *Neisseria meningitidis*

la PMM cerca di rispondere a tre quesiti principali:

W.W.W
Come Quando Perché

attraverso tre indirizzi applicativi

Indicazione per l'utilizzo

1 – confermare la presenza di un'infezione sospettata clinicamente ma non provata ante-mortem.

Uomo, 29 anni

Febbre persistente 39°, tosse, faringite – Trattato con ceftriaxone

20 giorni prima incisione di un ascesso senza richiesta di esami microbiologici

Preso in carico inizia terapia antibiotica empirica (Amikacina, Teicoplanina, Levofloxacin)

Nonostante la terapia antibiotica al 13° giorni di ricovero la temperatura si mantiene elevata 39-40°

15° giorno la terapia viene modificata (Pip/Tazo, Metronidazolo, Amikacina)

23° giorno la terapia viene modificata (Pip/Tazo, Linezolid, Fluconazolo)

24° giorno Exitus

Emocolture effettuate al giorno 1, 14, 15, 24 → **NEG**

PMM

Tessuto cardiaco/valvole

Polmoni

Fegato

LCR

Sangue

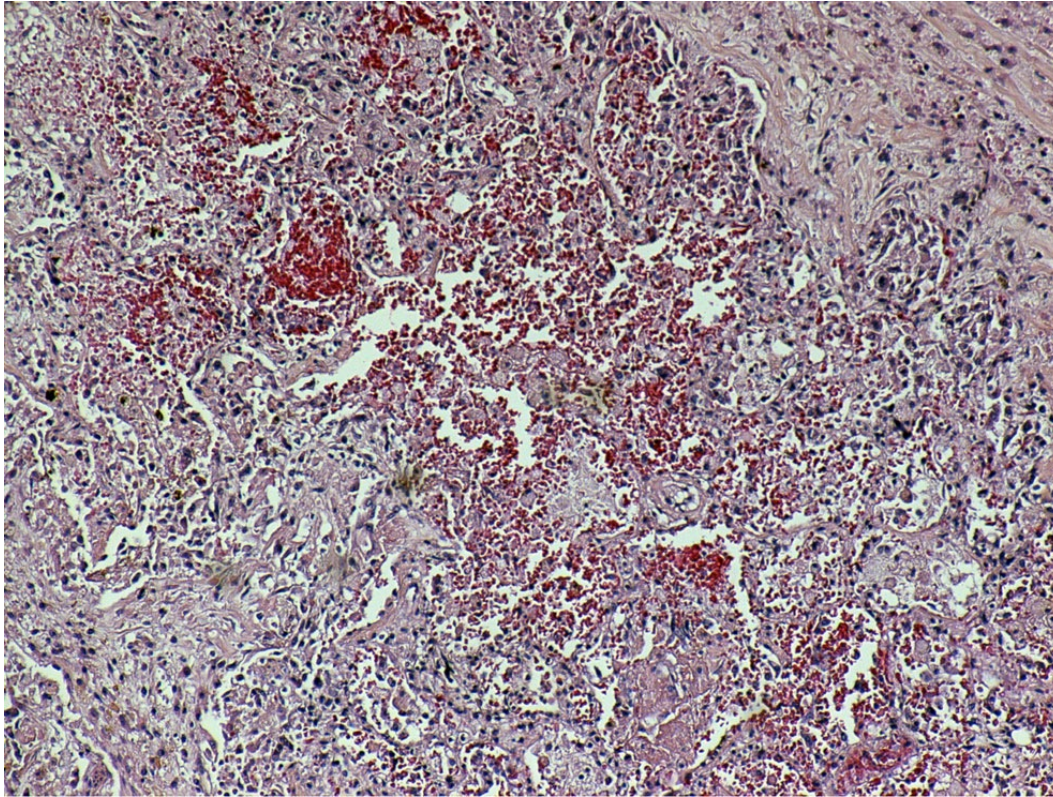
Klebsiella pneumoniae MDR

[Int J Legal Med.](#) 2015 Sep;129(5):1097-101. doi: 10.1007/s00414-015-1160-z. Epub 2015 Feb 13.

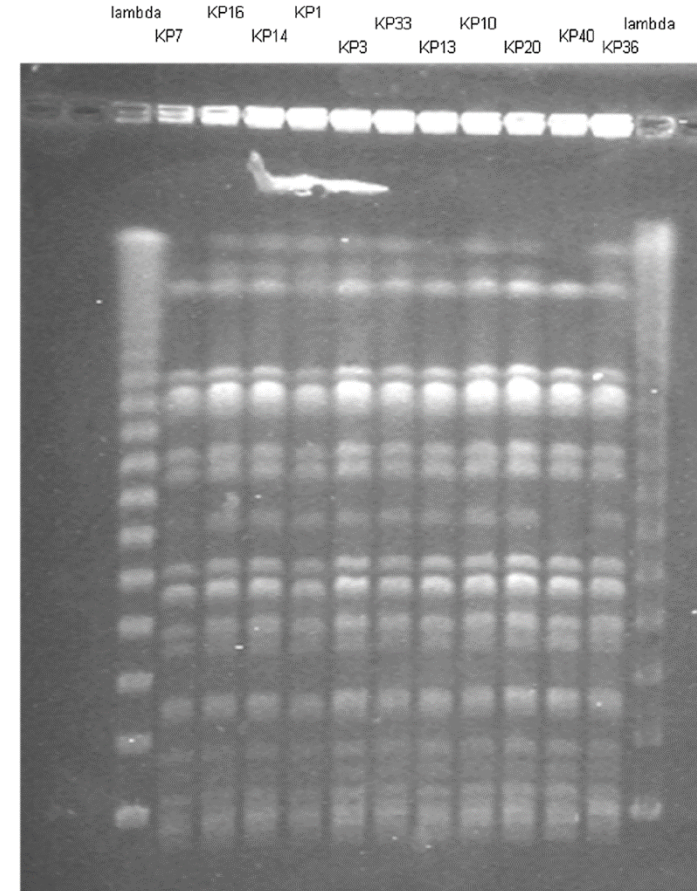
Fatal sepsis by *Klebsiella pneumoniae* in a patient with systemic lupus erythematosus: the importance of postmortem microbiological examination for the ex post diagnosis of infection.



[D'Ovidio C¹](#), [Pompilio A](#), [Crocetta V](#), [Gherardi G](#), [Carnevale A](#), [Di Bonaventura G](#).



Seziona istologica del tessuto pericardico



PFGE

[Int J Legal Med.](#) 2015 Sep;129(5):1097-101. doi: 10.1007/s00414-015-1160-z. Epub 2015 Feb 13.

Fatal sepsis by *Klebsiella pneumoniae* in a patient with systemic lupus erythematosus: the importance of postmortem microbiological examination for the ex post diagnosis of infection.

[D'Ovidio C¹](#), [Pompilio A](#), [Crocetta V](#), [Gherardi G](#), [Carnevale A](#), [Di Bonaventura G](#).



Indicazione per l'utilizzo

2 – identificare in un'infezione la causa di una morte improvvisa.

Infante femmina nata alla 39° settimana, 3.050 gr
Parto vaginale, madre di 25 anni
Apgar score 10 al minuto 1, 5, 10
Tamponi vaginale e rettale alla 35° e alla 37° settimana: negativi per la ricerca di GBS
Al 3° giorno la neonata è priva di sensi, dal padre, nella culla
Nonostante le manovre rianimatorie è constatato l'exitus dai sanitari del 118
Viene richiesta l'autopsia (si sospetta un atto infanticida da parte della madre)
Vengono richiesti anche gli esami microbiologici a completamento dell'indagine

PMM

Tessuto cardiaco
Polmoni
Encefalo
Milza
Fegato
LCR
Sangue

Streptococcus agalactiae

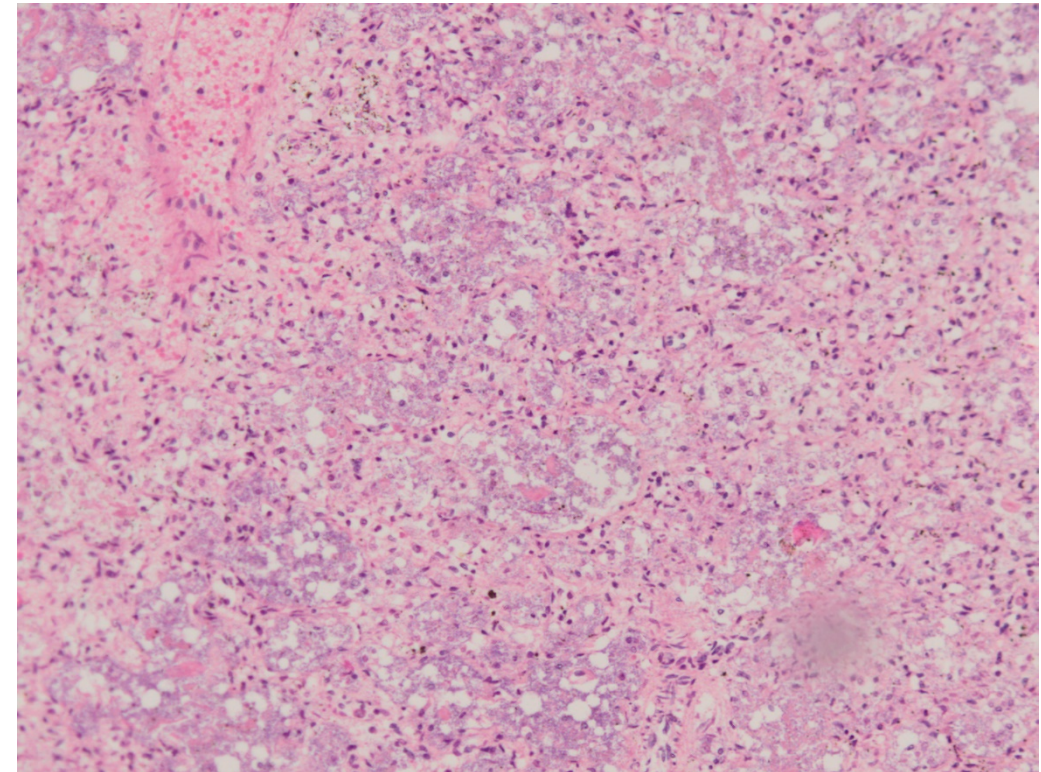
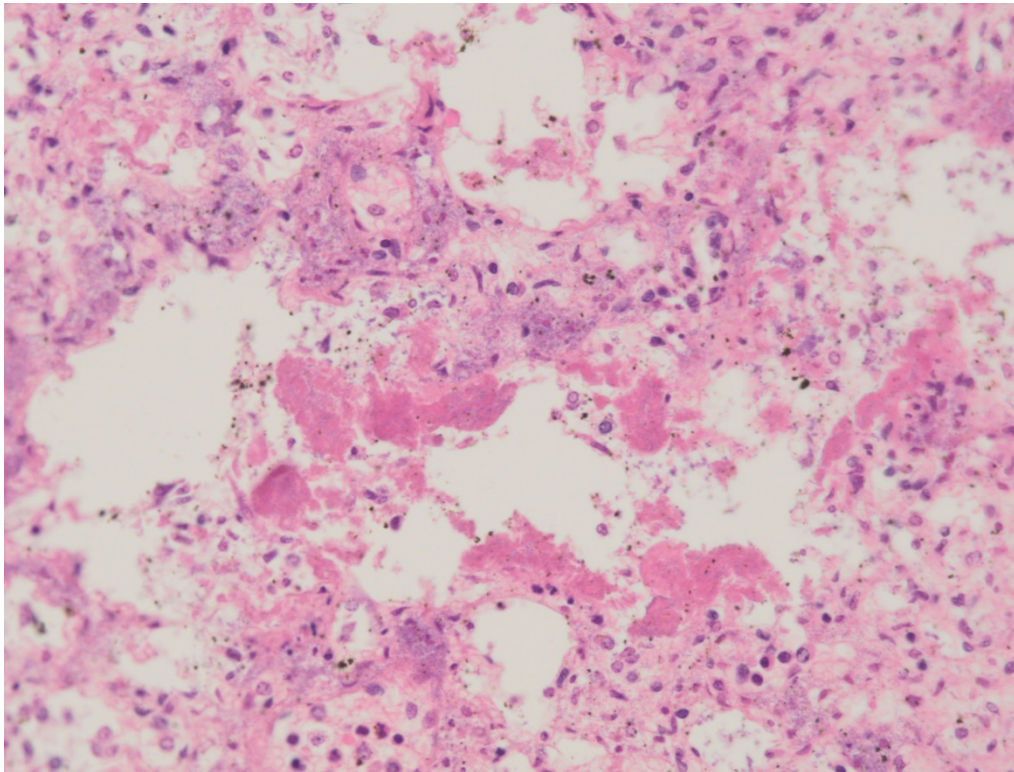
Case Report

Sudden Infant Death due to Early-Onset Group B Streptococcal Sepsis Diagnosed by *Post-mortem* Microbiology Analysis - A Case Report

D'Aleo F^{1*}, Di Bonaventura G^{2*}, Bonanno R¹,
Pompilio A², Zummo S³, Geminiani C² and
Gherardi G⁴

Open Access





Case Report

Sudden Infant Death due to Early-Onset Group B Streptococcal Sepsis Diagnosed by *Post-mortem* Microbiology Analysis - A Case Report

D'Aleo F^{1*}, Di Bonaventura G^{2*}, Bonanno R¹,
Pompilio A², Zummo S³, Geminiani C² and
Gherardi G⁴

Open Access



Indicazione per l'utilizzo

3 – valutare l'efficacia della terapia antibiotica nell'eradicare l'infezione

Donna di 50 anni

Ammessa in PS dopo un incidente stradale (investimento mentre attraversava)

La TAC mostra la frattura dell'orbita sinistra e dell'osso temporale.

Trasferita al reparto di chirurgia maxillo-facciale

Al 5° giorno si verifica un brusco peggioramento delle condizioni cliniche

Sindrome da distress respiratorio, temperatura 40,2°

Avviata terapia empirica (Teicoplanina 3x600mg e Levofloxacin 2x500mg)

Vengono effettuate emocolture

Il 6° giorno si verifica l'exitus improvviso

PMM

All'apertura della calotta cranica si apprezza un essudato purulento che coinvolge le meningi e il tessuto cerebrale.

- vengono effettuati ripetuti tamponi
- frammenti di tessuto cerebrale vengono inviati per le analisi microbiologiche

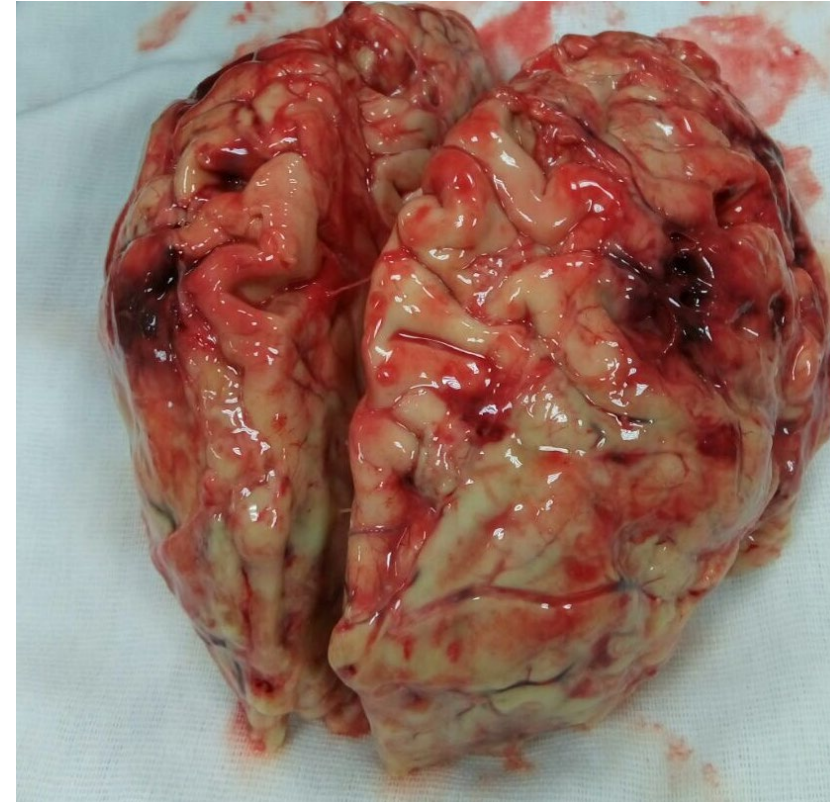
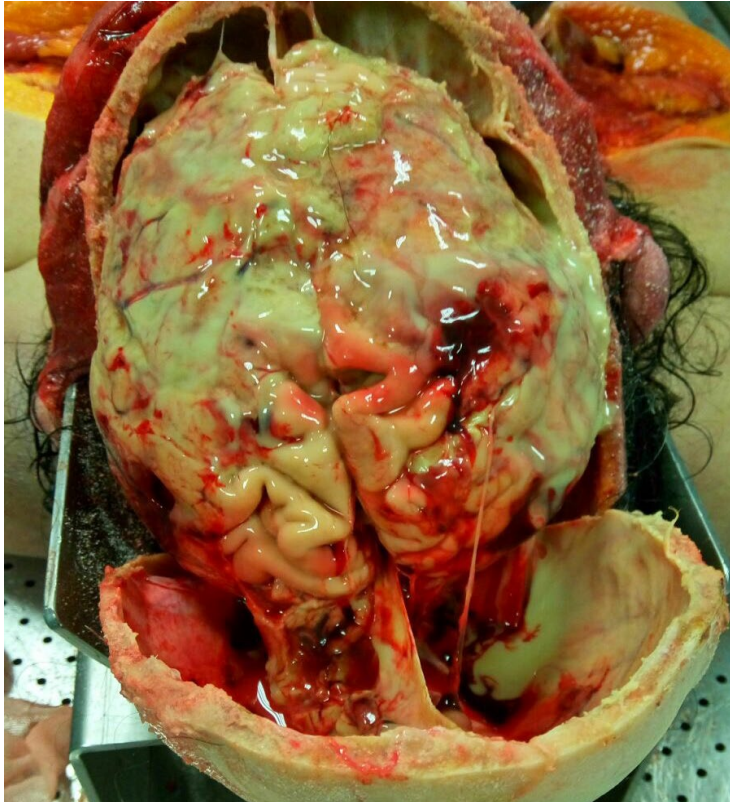
Klebsiella pneumoniae MDR

Postmortem microbiology as a routine tool for legal-medicine in Italy: is it time?

Francesco d'Aleo,¹ Roberta Bonanno,¹ Giovanna Bianco,¹ Antonino Trunzio²

Microbiologia Medica 2017; volume 32:6828





Postmortem microbiology as a routine tool for legal-medicine in Italy: is it time?

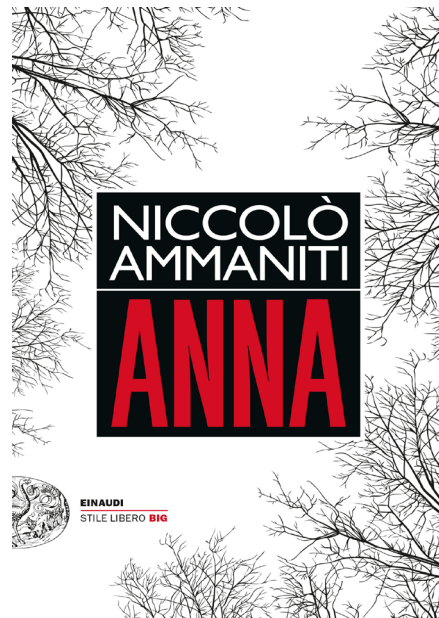
Francesco d'Aleo,¹ Roberta Bonanno,¹ Giovanna Bianco,¹ Antonino Trunfio²

Microbiologia Medica 2017; volume 32:6828



Conclusioni

...



*«la vita non ci appartiene,
ci attraversa»*