

# MICOBATTERIOLOGIA

**Editore:**

**Enrico Tortoli**

**Autori:**

**Annapaola Callegaro** (Spedali Riuniti, Bergamo)

**Andrea Cuboni** (Fondazione Monzino, Milano)

**Marco Liguori** (Ospedale Brotzu, Cagliari)

**Daniela Marchetti** (Ospedale Bellaria, Bologna)

**Maria Teresa Mascellino** (Clinica Malattie Infettive, Roma)

**Cristiana Passerini-Tosi** (Spedali Riuniti, Bergamo)

**Claudio Piersimoni** (Ospedale Umberto I-Torrette, Ancona)

**Claudio Scarparo** (Ospedale S. Bortolo, Vicenza)

**Enrico Tortoli** (Ospedale Careggi, Firenze)

**Presentazione:**

**Ferruccio Mandler** (Coordinatore Comitato Micobatteri, AMCLI)

**1998**

## INDICE

<b>PRESENTAZIONE .....</b>	<b>5</b>
<b>PRESENTAZIONE DELL'EDIZIONE INFORMATICA.....</b>	<b>5</b>
<b>1 LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 VIE DI PENETRAZIONE RELATIVE ATTIVITÀ LAVORATIVE CHE POSSONO ESPORRE AL RISCHIO DI INFEZIONE .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 PROCEDURE E PRATICHE MICROBIOLOGICHE STANDARD.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 PRATICHE SPECIALI.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 EQUIPAGGIAMENTO DI BIOSICUREZZA RACCOMANDATO.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 STRUTTURA DEL LABORATORIO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 MISURE DI DISINFEZIONE E STERILIZZAZIONE .....</b>	<b>12</b>
1.6.1 Disinfezione: .....	12
1.6.2 Sterilizzazione: .....	12
<b>2 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI.....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Micobatteriosi polmonari .....	14
2.1.2 Micobatteriosi extra-polmonari.....	16
<b>2.2 CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 IDONEITÀ DEI CAMPIONI .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....</b>	<b>17</b>
<b>3 ESAME MICROSCOPICO .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 PREPARAZIONE DELLO STRISCIO.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 COLORAZIONE .....</b>	<b>21</b>
3.2.1 Colorazione di Ziehl-Neelsen (carbolfucsina a caldo).....	21
3.2.2 Colorazione di Kinyoun (carbolfucsina a freddo).....	21
3.2.3 Colorazione con auramina.....	22
<b>3.3 OSSERVAZIONE MICROSCOPICA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 REFERTAZIONE.....</b>	<b>23</b>
<b>4 ESAME CULTURALE.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 DECONTAMINAZIONE.....</b>	<b>25</b>

<b>4.2 COLTURA SU TERRENI SOLIDI.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 COLTURA SU TERRENI LIQUIDI .....</b>	<b>30</b>
4.3.1 Sistema MGIT .....	30
4.3.2 Sistema bifasico Septi-Chek.....	31
4.3.3 Sistema MB Redox.....	32
<b>4.4 COLTURA SU TERRENO RADIOMETRICO (BACTEC).....</b>	<b>34</b>
<b>4.5 COLTURA CON SISTEMI AUTOMATICI NON RADIOMETRICI .....</b>	<b>36</b>
1.5.1 MB/BacT .....	36
4.5.2 Bactec 9000/F MB .....	37
4.5.3 Bactec MGIT 960.....	37
4.5.4 ESP Culture System II.....	38
<b>4.6 EMOCOLTURA SU TERRENO RADIOMETRICO (BACTEC) .....</b>	<b>40</b>
<b>4.7 EMOCOLTURA COL SISTEMA ISOLATOR.....</b>	<b>42</b>
<b>5 IDENTIFICAZIONE .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1 IDENTIFICAZIONE MEDIANTE TEST BIOCHIMICO-COLTURALI .....</b>	<b>47</b>
5.1.1 Arilsolfatasi (3 giorni).....	47
5.1.2 $\beta$ -glucosidasi.....	47
5.1.3 Attività catalasica .....	48
5.1.4 Test colturali.....	49
5.1.5 Test di inibizione selettiva.....	50
5.1.6 Accumulo di niacina.....	51
5.1.7 Riduzione dei nitrati .....	52
5.1.8 Riduzione del tellurito .....	52
5.1.9 Idrolisi del Tween 80.....	53
5.1.10 Ureasi .....	53
<b>5.2 IDENTIFICAZIONE CON NAP-TEST .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3 IDENTIFICAZIONE CON HPLC .....</b>	<b>56</b>
<b>5.4 IDENTIFICAZIONE CON DNA-PROBE .....</b>	<b>59</b>
<b>6 TEST DI SENSIBILITÀ.....</b>	<b>61</b>
<b>6.1 TEST DI SENSIBILITÀ PER <i>M. tuberculosis</i> complex.....</b>	<b>61</b>
6.1.1 I farmaci antitubercolari .....	61
6.1.2 Saggio su terreni solidi.....	63
6.1.3 Test diretto di sensibilità .....	69
6.1.4 Saggio su terreno radiometrico Bactec.....	69
6.1.5 Saggio su terreno MGIT.....	74
<b>6.2 TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI NON TUBERCOLARI A CRESCITA LENTA .....</b>	<b>77</b>
6.2.1 <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> COMPLEX (MAC) .....	77

6.2.2 TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI A LENTA CRESCITA NON TUBERCOLARI E NON MAC.....	78
<b>6.3 SAGGIO DELLE ASSOCIAZIONI.....</b>	<b>79</b>
<b>6.4 TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA .....</b>	<b>81</b>
<b>7 TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE GENICA .....</b>	<b>83</b>
<b>7.1 I TEST COMMERCIALI .....</b>	<b>84</b>
7.1.1 Amplified <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Direct Test (MTD, GenProbe) .....	84
7.1.2 LCx <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Abbott) .....	87
7.1.3 Amplicor <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e Cobas Amplicor (Roche).....	89
<b>7.2 USO CLINICO DEI TEST DI AMPLIFICAZIONE .....</b>	<b>92</b>
<b>7.3 PROBLEMATICHE DELLE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE.....</b>	<b>92</b>
<b>8 SIEROLOGIA .....</b>	<b>95</b>
<b>8.1 Generalità.....</b>	<b>95</b>
<b>8.2 Le varie classi immunoglobuliniche.....</b>	<b>96</b>
<b>8.3 I kit per la sierologia della tubercolosi .....</b>	<b>98</b>
8.3.1. Antigene A60 .....	98
8.3.2 Antigene di 38 kDa (Antigene 5) associato ad antigene da 16 kDa.....	98
8.3.3 Antigene di 38 kDa associato a lipoarabinomannano .....	99
8.3.4 Lipoarabinomannano (LAM) .....	99
8.3.5 Antigene kP 90 (ImCRAC).....	99
8.3.6 <i>Cocktail</i> di 5 peptidi sintetici e proteine ricombinanti .....	99
<b>9 REFERTAZIONE.....</b>	<b>101</b>
<b>10 ORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI MICOBATTERIOLOGIA.....</b>	<b>103</b>
<b>CLAUDIO SCARPARO .....</b>	<b>103</b>
<b>INDICE ANALITICO .....</b>	<b>106</b>

## PRESENTAZIONE

Ferruccio Mandler

Recenti disposizioni di alcune Regioni italiane identificano i laboratori in grado di eseguire indagini micobatteriologiche e ne stabiliscono i livelli di attività. Ciò non toglie tuttavia che molti laboratori, anche di piccole dimensioni e quindi con un modesto bagaglio di esperienza, si cimentino saltuariamente in questo tipo di indagini.

“Micobatteriologia”, primo volume della nuova serie dei Quaderni di Microbiologia, redatto da componenti del Comitato per lo studio dei micobatteri in seno all’Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI), si propone la divulgazione delle tecniche di riferimento per le principali indagini relative ai micobatteri. L’adozione di tali tecniche, da parte dei singoli laboratori, consentirebbe un’auspicabile uniformazione delle procedure e conseguentemente una migliore confrontabilità dei risultati; renderebbe quindi più efficace il supporto del microbiologo alla lotta contro la tubercolosi nell’ottica di una diagnosi precoce della malattia, di un trattamento mirato e di un approfondimento delle problematiche più scottanti, quali quella della crescente diffusione della resistenze multiple.

Le tecniche presentate, fatti salvi alcuni punti cruciali per i quali suggeriscono un’unica metodica di riferimento, lasciano una certa libertà di scelta all’operatore a seconda delle dimensioni del centro in cui opera e del carico di lavoro. Questa libertà diversifica forse, in parte, la situazione italiana da quella di altri paesi europei rendendo più complessa l’analisi costo-beneficio e le sue implicazioni in tema di redditività clinica e di rispondenza socio-epidemiologica.

## PRESENTAZIONE DELL’EDIZIONE INFORMATICA

Pasquale Urbano

La presente edizione contiene i testi dei vari capitoli coordinati da Enrico Tortoli, che li ha raccolti dai diversi autori. Io mi sono limitato, con la collaborazione di Enrico Tortoli, a riformattare il materiale, imponendo una struttura uniforme ai vari capitoli e paragrafi, e inserendoli in un documento *master*, a partire dal quale risulta facilitata la consultazione.

# 1 LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA

Claudio Scarparo

Il laboratorio di micobatteriologia costituisce un ambiente di lavoro dove, per la pericolosità dei materiali processati e per la complessità delle attività che vi si svolgono, deve essere posta una particolare attenzione alla tutela della salute e della sicurezza degli operatori sanitari. Il Decreto Legge N° 626 del 19 settembre 1994, che raccoglie le direttive riguardanti la sicurezza ed i principi base per le misure di prevenzione e di protezione del rischio di incidenti ed infortuni nell'ambiente di lavoro, contiene nel titolo VIII le norme riguardanti il rischio di esposizione ad agenti biologici, e classifica il *Mycobacterium tuberculosis* nel gruppo 3 (tabella 1). Nell'allegato XII vengono inoltre elencate le specifiche relative alle misure di contenimento (tabella 2).

**Tabella 1. Classificazione degli agenti biologici a seconda del rischio di infezione (D.L. 626/94)**

Gruppo 1	agente che presenta poche probabilità di causare malattia in soggetti umani
Gruppo 2	agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche
Gruppo 3	agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche
Gruppo 4	agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche

L'alta infettività del *Mycobacterium tuberculosis* è correlata alla bassa dose infettante per l'uomo (50% della dose infettante <10 bacilli). L'incidenza dell'infezione tubercolare, fra il personale di laboratorio, è stimata essere da tre a nove volte maggiore di quella fra individui che svolgono altre attività lavorative. È stata riportata un'incidenza annuale di tubercolosi, fra il personale di laboratorio in Utah, di 0.3 infezioni su 1000 persone, mentre in Gran Bretagna l'incidenza varia da 0.035 a 0.56 infezioni su 1000 persone. Uno studio di Muller, su 77 laboratori di micobatteriologia, ha evidenziato un'incidenza di 26.3 infezioni per 1000 addetti, pari a 100 volte la frequenza nella popolazione generale.

Studi sulla trasmissione della tubercolosi conducono al concetto di droplet nuclei, le goccioline di diverse dimensioni che, come evidenziato fotograficamente, vengono liberate in grande quantità con starnuti o colpi di tosse. Quelle molto piccole evaporano con estrema rapidità trasformandosi in pochi centesimi di secondo in una massa disidratata contenente le sostanze precedentemente in soluzione e alcune particelle trasportate dalla gocciolina stessa. Le goccioline più grandi di 140 µm prima di evaporare si depositano sulle superfici contaminandole e divenendo possibili fonti di infezione attraverso lesioni cutanee o inoculazioni accidentali. I residui delle goccioline più piccole di 140 µm, una volta evaporate, rimangono nell'aria per lunghissimi periodi di tempo a causa delle loro proprietà aerodinamiche. Le particelle di diametro <5 µm, se inalate, possono raggiungere gli alveoli polmonari e dare inizio all'infezione, mentre quelle di diametro >5 µm vengono bloccate dalle membrane mucose delle vie aeree e rimosse dai meccanismi di difesa dell'apparato respiratorio. L'utilizzo di una maschera chirurgica o di un fazzoletto, davanti alla bocca del paziente, minimizza la produzione di *droplet nuclei*, perché il tessuto raccoglie tutte le minuscole goccioline, agglomerandole in una massa

fluida nel tessuto della maschera, prima che abbiano il tempo di evaporare. Questo metodo di prevenzione della formazione di *droplet nuclei* non è altrettanto valido per la prevenzione della esposizione (barriera alla aspirazione di *droplet nuclei*). Una volta che queste particelle si sono formate possono penetrare le fibre dei tessuti o delle mascherine chirurgiche che si rivelano quindi inadeguate, come barriere fisiche alla trasmissione della tubercolosi.

**Tabella 2. Specifiche sulle misure e sui livelli di contenimento (D.L. 626/94, allegato XII)**

Misure di contenimento	Livello di contenimento 3
La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio	Raccomandato
L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile	Si, sull'aria estratta
L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Si
La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	Raccomandato
Sono richieste specifiche procedure di disinfezione	Si
La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	Raccomandato
Deve essere effettuato un controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti	Si
Superficie idrorepellenti e di facile pulitura	Si, per il banco di lavoro, l'arredo e il pavimento
Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Si
Deposito sicuro per agenti biologici	Si
La stanza deve avere una finestra di ispezione o altro dispositivo che permetta di vederne gli occupanti	Raccomandato
I laboratori devono contenere l'attrezzatura a loro necessaria	Raccomandato
I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cabine di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori	Si, quando l'infezione è veicolata dall'aria
Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse di animali	Si
Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Si
Trattamento delle acque reflue	Facoltativo

La formazione di aerosol, in seguito alla manipolazione di campioni o colture, è il più importante fattore di rischio di infezione da *Mycobacterium tuberculosis* per il personale di laboratorio. L'infezione può avvenire anche in seguito a lesioni o ferite cutanee. Il contatto diretto con la cute o con membrane mucose, l'ingestione o l'accidentale inoculo parenterale rappresentano i principali rischi di laboratorio associati alla manipolazione di materiali o colture contenenti micobatteri non tubercolari (*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, ecc.).

L'esposizione ad agenti infettivi può avvenire quindi in modi diversi. L'infezione dipende dalla concentrazione e dalla virulenza dell'agente infettante, dalla via di penetrazione e dalla sensibilità dell'ospite.

## **1.1 VIE DI PENETRAZIONE RELATIVE ATTIVITÀ LAVORATIVE CHE POSSONO ESPORRE AL RISCHIO DI INFEZIONE**

### **Inalazione: attività lavorative che generano aerosol**

Manipolazione di anse da batteriologia. Sfregamento dell'ansa su un terreno di coltura, soprattutto se la superficie è ruvida. Striscio del materiale sulla superficie di un vetrino. Raffreddamento dell'ansa di metallo nel terreno di coltura. Flambaggio dell'ansa di metallo. Utilizzo improprio delle pipette. Agitazione di sospensioni batteriche. Scarico della pipetta su una superficie rigida. Manipolazione di aghi e siringhe. Espulsione di aria da tubi o bottiglie. Estrazione dell'ago dal tappo di un flacone. Separazione dell'ago dalla siringa sotto pressione. Centrifugazione di materiale infetto, soprattutto quando si verifica un danno ai contenitori durante la centrifugazione. Utilizzo di miscelatori, omogeneizzatori, sonicatori, agitatori e vortex su campioni clinici o colture. Versamento o travaso di brodocolture e rovesciamento del materiale infetto. Apertura di tappi o coperchi dei contenitori dei terreni di coltura. Liofilizzazione e filtrazione sotto vuoto.

Gli aerosol contaminano persone, superfici, strumenti e canali di aerazione.

### **Ingestione: attività lavorative correlate alla trasmissione orale**

Pipettaggio a bocca. Schizzi di materiale infetto in bocca. Introduzione di materiale contaminato o dita in bocca. Ingestione di cibo o bevande, applicazione di rossetto, fumo, nelle aree di lavoro.

### **Inoculazione: attività correlate a trasmissione intravenosa diretta o sottocutanea**

Manipolazione di aghi e siringhe. Maneggiamento di vetri rotti, bisturi e altri oggetti appuntiti o taglienti.

### **Inoculazione: attività correlate alla contaminazione della cute e delle mucose**

Schizzi di materiale infetto negli occhi, bocca, naso e sulla pelle. Esposizione della cute non integra a materiale contaminato. Lavoro su superfici contaminate. Maneggiamento di equipaggiamenti contaminati. Manipolazione non corretta di anse, aghi da inoculo o tamponi contenenti campioni o materiale da coltura.

## **1.2 PROCEDURE E PRATICHE MICROBIOLOGICHE STANDARD**

Una buona tecnica microbiologica e le precauzioni universali sono essenziali per la sicurezza in laboratorio.

Tutti i campioni biologici devono essere considerati infetti e devono pervenire in laboratorio in un doppio contenitore di sicurezza, tenendo ben separato l'eventuale modulo di richiesta.

Il personale di laboratorio deve avere una specifica preparazione nella manipolazione di materiali contenenti micobatteri, e deve indossare guanti e, eventualmente, barriere di protezione facciale per prevenire la possibilità di schizzi di materiale. E' doveroso lavarsi le mani dopo aver maneggiato materiali infetti e prima di lasciare il laboratorio.

Nelle aree di lavoro deve essere vietato il fumo, il consumo di cibo e bevande, la conservazione di alimenti nei frigoriferi e l'applicazione di cosmetici. Il portare oggetti alla bocca deve essere assolutamente evitato. Le persone che portano lenti a contatto devono munirsi di occhiali di protezione o barriere di protezione facciale.

Il laboratorio deve essere tenuto pulito, in ordine e sgombro da qualsiasi oggetto non pertinente al lavoro. Devono essere minimizzate tutte le procedure che possono creare aerosol (vedi sopra). Le superfici di lavoro devono essere decontaminate dopo qualsiasi versamento di materiali potenzialmente pericolosi ed alla fine di ogni giorno di lavoro.

Tutti i campioni, le colture e i materiali contaminati devono essere decontaminati prima di essere eliminati o, se riciclabili, prima di essere sottoposti a lavaggio per il riutilizzo (soluzione al 10% di ipoclorito di sodio o altro disinfettante adatto). Vanno posti in sacche di plastica a tenuta per essere autoclavati o inceneriti sul posto. Queste sacche devono essere poste in contenitori rigidi a tenuta (con fondo solido) che possono essere chiusi se devono essere rimossi dal laboratorio.

### 1.3 PRATICHE SPECIALI

Sulla porta del laboratorio di micobatteriologia deve essere esposto il simbolo internazionale di rischio biologico. L'accesso alle aree del laboratorio deve essere limitato alle persone autorizzate, che possiedano i necessari requisiti per l'ammissione (quali l'immunizzazione). Le porte del laboratorio devono essere tenute chiuse durante il lavoro.

Aghi ipodermici e siringhe non devono essere usati come sostituti delle pipette nella manipolazione di fluidi infetti. Gli aghi in particolare non devono essere reincapucciati, piegati o rimossi con le mani, ma depositati in appositi contenitori resistenti alla perforazione. Usare siringhe ad ago fisso o Luer-Lok.

**Tabella 3. Disinfettanti, diluizioni d'uso e proprietà**

Disinfettante	Diluizione d'uso	Livello di disinfezione <sup>a</sup>	A <sup>b</sup>	B <sup>b</sup>	C <sup>b</sup>	D <sup>c</sup>	E <sup>b</sup>	F <sup>d</sup>	G	H	I	L	M	N	O	P
Alcool isopropilico	60 - 95%	Intermedio	+	+	-	+	+	-	+	+/-	-	+	+/-	+	-	+
Perossido di idrogeno	3 - 25%	CS /Alto	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	+	-	+
Formaldeide	3 - 8%	Alto/ Intermedio	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-	+	+	+	+
Composti di ammonio quaternario	0.4 - 1.6% (acquosa)	Basso	+	+	-	-	+/-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Composti fenolici	0.4 - 5% (acquosa)	Intermedio/Basso	+	+	+/-	+	+/-	-	+	-	+	+/-	+	+	-	+
Cloroderivati	100-1000 ppm di cloro libero <sup>c</sup>	Alto/Basso	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
Iodofori	30 - 50 ppm di iodio libero	Intermedio	+	+	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+	+	+/-	+	-	+
Glutaraldeide	2%	CS/Alto	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

A, batteri; B, virus lipofili; C, virus idrofili; D, *M. tuberculosis*; E, miceti; F, spore batteriche; G, durata > 1 settimana; H, corrosivo o effetti deleteri; I, attività residua; L, inattivato da sostanze organiche; M, irritante per la pelle; N, irritante per gli occhi; O, irritante per le vie respiratorie; P, tossico

<sup>a</sup> CS, sterilizzante chimico

<sup>b</sup> inattiva tutti i micorganismi indicati con un tempo di contatto ≤ 30 minuti

<sup>c</sup> almeno 10.000 ppm di cloro libero sono necessarie per uccidere i micobatteri

<sup>d</sup> le spore richiedono 6 –10 ore di contatto

Il fissaggio dei vetrini su una piastra riscaldata (65-80°C per 2-2.5 ore) può non uccidere tutti i micobatteri eventualmente presenti sulla superficie del vetrino che deve quindi essere maneggiato con cura.

In caso di incidenti o versamenti di colture micobatteriche occorre evacuare l'area per almeno 30 minuti chiudendo le porte, per permettere all'aerosol di depositarsi. Successivamente è possibile entrare nella stanza dotati, se necessario, di maschera a viso interamente coperto, dotata

di filtri ad alta efficienza. Occorre assorbire il liquido versato e disinfettare appena possibile l'area di versamento (usando soluzione acquosa di ipoclorito di sodio al 10%, derivati del fenolo al 2.5 - 5%, alcool isopropilico al 70% o altra soluzione efficace). Per altri disinfettanti commerciali, seguire le istruzioni del produttore.

Devono essere presenti delle procedure scritte per il trattamento dei versamenti di materiali infetti. Deve essere tenuta una registrazione scritta di tutti gli incidenti avvenuti in laboratorio.

Occorre decontaminare periodicamente il laboratorio con lampade a raggi ultravioletti o formaldeide.

Gli strumenti di laboratorio devono essere decontaminati e puliti prima dell'intervento dei tecnici addetti alla manutenzione o alla riparazione o prima di essere inviati alle case costruttrici per eventuali riparazioni o restituzioni; in caso contrario vanno contrassegnati con il segnale di rischio biologico. Devono esistere indicazioni scritte riguardo a quali disinfettanti usare per quale scopo, e la diluizione raccomandata per ciascuno di essi (tabella 3).

In tutte le procedure che comportino il rischio di contatto diretto con sangue e materiali infetti, devono essere indossati guanti adeguati al lavoro che si svolge. Dopo l'uso, i guanti contaminati devono essere eliminati e mai riutilizzati. Occorre lavare le mani dopo aver tolto i guanti.

Le piastre o le provette di coltura dei micobatteri devono essere chiuse ed eliminate mediante sterilizzazione in autoclave e successivo smaltimento o mediante incenerimento.

Gli operatori esposti a rischio devono essere sottoposti a una sorveglianza sanitaria da parte del medico competente. Per i soggetti negativi alla intradermoreazione con PPD è raccomandata la vaccinazione con BCG. La profilassi con isoniazide è raccomandata qualora si rilevi la cuti-conversione in un soggetto non vaccinato. Controlli radiografici del torace, eseguiti con cadenza annuale o biennale, sono consigliati per il personale operante a tempo pieno nei laboratori di micobatteriologia.

## 1.4 EQUIPAGGIAMENTO DI BIOSICUREZZA RACCOMANDATO

Cappe di sicurezza biologica a flusso laminare tipo II, devono essere usate ogni qualvolta si eseguano operazioni che possono liberare aerosol o qualora vi sia il rischio di infezioni per via aerea, come ad esempio per l'apertura di contenitori dopo centrifugazione, la miscelazione, l'agitazione, il rimescolamento vigoroso o la sonicazione, e l'apertura di contenitori di materiali infetti, la cui pressione possa essere maggiore di quella dell'ambiente circostante. Le cappe di sicurezza sono inoltre necessarie quando si manipolino forti concentrazioni o grandi volumi di materiali infetti. La griglia sul piano di lavoro della cabina di sicurezza non deve essere ostruita con fogli, teli o apparecchiature, questi infatti possono formare vortici pericolosi per l'operatore. Le cappe di sicurezza proteggono dall'aerosol ma non dalla contaminazione cutanea. Per ogni cappa di sicurezza deve essere previsto un programma periodico di disinfezione, manutenzione e sostituzione dei filtri, e il tutto deve essere registrato in apposite schede.

Le centrifughe, devono essere dotate di contenitori di sicurezza, in grado di contenere l'aerosol prodotto in caso di rottura di una provetta. Le provette per centrifuga devono avere il tappo a vite. I contenitori devono essere riempiti, chiusi ed aperti in una cappa di sicurezza biologica. I contenitori, i rotori e l'interno delle centrifughe devono essere decontaminati regolarmente.

Occorre usare prepipette o pipettatori automatici per evitare di pipettare a bocca; le pipette Pasteur in plastica sono preferibili a quelle in vetro.

Per ridurre la formazione di aerosol si possono usare sterilizzatori elettrici per anse. Sono tuttavia preferibili le anse monouso in plastica che devono essere poste in un contenitore con sabbia ed una soluzione di fenolo al 5% o alcool al 95% per rimuovere l'eccesso di inoculo prima dell'incenerimento.

Barriere di protezione facciale (occhiali, maschera o visiera protettiva) sono utili qualora si renda necessaria la manipolazione di materiali infetti fuori della cappa di sicurezza biologica.

Per conservare campioni e colture devono essere impiegate provette e bottiglie con tappo a vite.

L'autoclave costituisce il sistema di scelta per la sterilizzazione dei materiali contaminati.

L'uso di respiratori non è normalmente richiesto nel laboratorio di micobatteriologia, tuttavia una maschera a viso interamente coperto, dotata di filtri ad alta efficienza per le particelle deve essere a disposizione del lavoratore nell'eventualità che venga prodotto aerosol.

Durante il lavoro deve essere sempre indossato il camice; è preferibile il tipo con apertura posteriore. Questi indumenti non vanno indossati in aree diverse dai laboratori, come uffici, biblioteche, sale del personale o mense. Gli indumenti contaminati devono essere decontaminati con metodi appropriati prima di essere lavati. Gli indumenti di laboratorio non devono essere tenuti negli stessi armadi degli abiti normali.

Il datore di lavoro e/o il direttore del laboratorio, il responsabile della sicurezza, il medico competente ed i dirigenti devono informare gli operatori dei rischi specifici ai quali sono esposti ed istruirli al rispetto delle misure di sicurezza, devono inoltre assicurare la fornitura di strutture, strumentazioni e materiali adeguati e sorvegliare sul loro corretto utilizzo. Deve essere adottato un manuale operativo e di sicurezza che identifichi i rischi effettivi e che riporti linee guida e protocolli per minimizzare o eliminare questi rischi.

Le attrezzature dovrebbero essere progettate in modo tale da prevenire o limitare i contatti fra l'operatore e il materiale infetto; prodotte con materiali impermeabili ai liquidi, resistenti alla corrosione, e che rispettino determinati requisiti strutturali: prive di punte e spigoli taglienti e di parti in movimento non protette; progettate, costruite ed installate in modo da garantire semplicità d'uso, di manutenzione, di pulizia e di decontaminazione.

I sistemi di sicurezza devono comprendere un sistema antincendio, un impianto elettrico di emergenza, docce di emergenza e dotazioni per il lavaggio degli occhi.

La maggior parte dei rischi in laboratorio è dovuta ad errore umano, per inesperienza, disinformazione, per distrazione o per eccessiva confidenza con il rischio biologico. Tali errori compromettono spesso l'efficacia delle migliori misure di sicurezza e delle stesse apparecchiature appositamente destinate alla protezione dell'operatore. Sono oggi disponibili conoscenze tecniche e strumentali che consentono di prevenire la maggior parte delle infezioni in laboratorio.

## **1.5 STRUTTURA DEL LABORATORIO**

Una corretta progettazione strutturale del laboratorio e l'adozione di adatte apparecchiature consentono di ridurre notevolmente il rischio di infezione in laboratorio. E' quindi importante la loro corrispondenza ai criteri di sicurezza dettati dalla legislazione vigente sulla sicurezza (tabella 2).

La pressione negativa all'interno del laboratorio, pur non costituendo una misura di salvaguardia della salute di chi vi opera, ha infatti lo scopo di evitare la diffusione dei micobatteri negli ambienti circostanti, rappresenta un requisito da cui i laboratori di nuova costruzione non dovrebbero prescindere.

Pur non esistendo requisiti specifici per la ventilazione, questa dovrebbe essere tale da consentire diversi ricambi d'aria ogni ora, con temperature tra 20 e 23°C e umidità del 50-60%. Dovrebbe essere possibile l'estrazione terminale dell'aria e l'immissione all'esterno dell'aria filtrata mediante filtri HEPA. Qualora non sia disponibile l'aerazione meccanica, le finestre devono essere apribili, e preferibilmente dotate di reti contro gli insetti.

## 1.6 MISURE DI DISINFEZIONE E STERILIZZAZIONE

### 1.6.1 Disinfezione:

processo che riduce od elimina completamente tutti i microrganismi patogeni ad eccezione delle spore. Un oggetto che è stato disinfettato in modo appropriato potrebbe teoricamente trasmettere ancora un microrganismo patogeno, tale possibilità è tuttavia fortemente ridotta.

### 1.6.2 Sterilizzazione:

uso di procedure fisiche o chimiche in grado di eliminare o distruggere completamente tutte le forme di vita microbica.

#### 1.6.2.1 Sterilizzazione fisica

- **Calore umido:** (autoclave a gravità, autoclave sotto vuoto, pentola a pressione). Il vapore acqueo saturo sotto pressione è il più efficace ed il principale agente utilizzato nei laboratori di microbiologia clinica. Per la routinaria sterilizzazione di terreni di coltura e materiali termostabili di laboratorio (provette, contenitori vari, piccoli strumenti chirurgici), il tempo di esposizione è di 15 min. a 121°C ad 1 atmosfera di pressione. Per la sterilizzazione di rifiuti infetti, colture micobatteriche o di altri microrganismi, il tempo di esposizione a 121°C è solitamente aumentato a 30-60 min. Il contatto diretto del vapore è una condizione critica per la sterilizzazione, occorre perciò adottare tutte le misure che facilitano la penetrazione del vapore nel carico di materiale infetto. L'uso di autoclavi sottovuoto consente di trattare i materiali di rifiuto a 132°C, e alla pressione di 2 atmosfere, riducendo il tempo di sterilizzazione a 10-20 min.
- **Incenerimento.** Rappresenta il metodo più usato per il trattamento dei rifiuti ospedalieri. Esistono diverse configurazioni per le camere di combustione; la temperatura nella camera primaria deve essere di almeno 870-980°C, e quella nella camera secondaria di almeno 1000°C. Il tempo di ritenzione del gas nella camera secondaria deve essere di almeno 0,5 s.
- **Filtrazione.** La filtrazione è un processo che rimuove microrganismi e particelle microscopiche da soluzioni, utilizzando delle membrane di acetato o nitrato di cellulosa con pori di 0,22 µm. Una ulteriore comune applicazione della filtrazione è la sterilizzazione dell'aria e dei gas. Filtri *High-Efficiency Particulate Air* (HEPA) sono usati nelle cappe di sicurezza biologica e nelle stanze a flusso laminare. Alcune riserve sono state avanzate circa l'efficacia, sui virus, della filtrazione.
- **Radiazioni ultraviolette (UV).** E' una forma di radiazione elettromagnetica (lunghezza d'onda di 254 nm) a cui sono altamente sensibili i microrganismi. L'efficacia delle radiazioni UV dipende dall'intensità della radiazione, dalla distanza dell'oggetto dalla fonte di UV, dall'umidità relativa e dalla specie microbica. Il principale svantaggio dell'uso delle radiazioni UV come mezzo di sterilizzazione è costituito dalla sua incapacità di penetrare i materiali. Per essere inattivato il microrganismo deve essere direttamente esposto alla luce UV, è quindi utilizzabile per la sterilizzazione di organismi presenti nell'aria e su superfici.
- **Radiazioni ionizzanti.** Microonde, raggi  $\gamma$ , raggi X ed elettroni sono utilizzati prevalentemente a livello industriale.

### 1.6.2.2 Sterilizzazione chimica

- **Acido p-acetico.** E' un agente ossidante con azione sporicida usabile da solo o in combinazione col perossido di idrogeno. Può essere impiegato allo 0.2% per strumenti diagnostici e chirurgici che possono esservi immersi. E' attivo in presenza di sostanze organiche e non è tossico.
- **Glutaraldeide 2-5%.** E' utilizzata per materiale medico o chirurgico che non può essere sterilizzato mediante il calore o le radiazioni.

### 1.6.2.3 Sterilizzazione gassosa

- **Ossido di etilene.** L'azione mutagenica e cancerogena ne riducono molto l'impiego in ambito ospedaliero. E' usato per materiali che non sopportano le alte temperature e l'eccessiva umidità.
- **Vapori di formaldeide.** Vengono usati nei laboratori per sterilizzare i filtri HEPA nelle cappe di sicurezza biologica, le stanze o le apparecchiature contaminate. Si può riscaldare la paraformaldeide ( $10,8 \text{ g/m}^3$ ) o bollire la formalina ( $35 \text{ ml/m}^3$ ) dopo aver sigillato porte e finestre. In alternativa, per non riscaldare, si può mescolare la formaldeide con due parti di permanganato di potassio; dopo aggiunta di acqua la miscela bolle violentemente e libera formaldeide. La temperatura di fumigazione deve essere  $> 23^\circ\text{C}$  e l'umidità relativa del 70%. Il gas deve rimanere a contatto con le superfici almeno 8-24 ore. E' poi indispensabile accendere per 1 ora la ventola di scarico e/o aerare la stanza.
- **Perossido di idrogeno.** Può essere vaporizzato usato per la disinfezione di cappe di sicurezza biologica e della superficie di strumentazioni medico-chirurgiche. Una soluzione acquosa di perossido di idrogeno al 30% viene introdotta in un vaporizzatore a  $55-60^\circ\text{C}$  per 90 min. Non produce sostanze tossiche ma è corrosivo per alcuni metalli, per la gomma ed il nylon.

## BIBLIOGRAFIA

- Best M., Sattar S.A., Springthorpe V.S., Kennedy M. Efficacies of selected disinfectants against *Mycobacterium tuberculosis*. 1990. J. Clin. Microbiol. 28:2234-2239.
- Decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626.
- Gilchrist M. Biosafety precautions for airborne pathogens. 1995. 67-76. In: Fleming D.O., Richardson J.H., Tullis J.I., Vesley D. (Ed.) Laboratory safety. Principles and practices. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Muller H. Laboratory-acquired mycobacterial infection. 1988. Lancet. ii:331.
- Rutala W.A. Disinfection, sterilization, and waste disposal. 1997. 539-593. In: R.P. Wenzel (Ed.) Prevention and control of nosocomial infections. The William e Wilkins Co., Baltimore.
- Sewell D. L. Laboratory-associated infections and biosafety. 1995. Clin. Microbiol.

## 2 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Cristiana Passerini Tosi

E' compito del microbiologo clinico fornire complete ed accurate istruzioni per la corretta raccolta, conservazione e trasporto dei campioni, la qualità del campione è infatti determinante ai fini di una corretta diagnosi microbiologica.

Al fine della necessaria sicurezza nella raccolta, è fondamentale considerare tutti i campioni come potenzialmente infetti. L'induzione dell'espettorato e la broncoscopia, che possono provocare l'emissione nell'ambiente di micobatteri infettanti, devono essere effettuate in locali idonei. Il personale deve usare appropriate barriere di protezione (maschera, guanti, camice, ecc.).

### Raccomandazioni generali:

- Utilizzare contenitori monouso di plastica sterili, impermeabili, con tappo a vite.
- Evitare l'uso di tamponi: solo nell'impossibilità di ricorrere ad altri tipi di prelievo utilizzare terreni di trasporto tipo Amies o Stuarts.
- Non utilizzare fissativi o conservanti.
- Etichettare il contenitore con il nome ed il numero identificativo del paziente, il tipo di materiale, la data e l'ora della raccolta.
- Raccogliere il materiale in quantità sufficiente per evitare falsi negativi.
- Raccogliere un adeguato numero di campioni, un numero inadeguato può dar luogo a risultati falsamente negativi.
- Eseguire la raccolta nel modo più asettico possibile, per evitare la contaminazione con altri microorganismi.
- Non contaminare la superficie esterna del contenitore.
- Eseguire la raccolta prima dell'inizio della terapia antimicobatterica.
- Inviare il campione al laboratorio il più rapidamente possibile, per assicurare la sopravvivenza dei micobatteri ed evitare la moltiplicazione di altri microorganismi contaminanti; in caso di ritardo di più di un'ora, conservare a +4°C; fanno eccezione le emocolture che vanno conservate a temperatura ambiente.

### 2.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Le principali caratteristiche dei campioni destinati alla ricerca dei micobatteri sono riportate nella tabella 4.

#### 2.1.1 Micobatteriosi polmonari

La localizzazione polmonare è di gran lunga la più frequente; pertanto la maggioranza dei campioni è rappresentata da secrezioni respiratorie raccolte con diverse modalità.

#### Espettorato

Fornire al paziente istruzioni al fine di impedire la raccolta di saliva o secrezioni nasofaringee:

**Tabella 4: Campioni per la ricerca di micobatteri**

Materiale	Quantità	N° campioni	Campioni non idonei
Aspirato gastrico	≥ 5/10 ml raccolto al mattino, al risveglio del paziente	3 in giorni consecutivi	campioni non neutralizzati con carbonato di sodio
Broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare, spazzolatura bronchiale, aspirato transtracheale	≥ 5 ml		
Espettorato	5-10 ml raccolto al mattino	3 in giorni consecutivi	saliva; pool di campioni
Espettorato indotto	5-10 ml raccolto al mattino	3 in giorni consecutivi	
Feci	≥ 1 g		campioni congelati
Liquidi cavitari	almeno 10-15 ml		
Liquor	≥ 2 ml		
Materiale da lesioni cutanee			tamponi senza terreno di trasporto
Midollo osseo	la massima possibile, in provetta con eparina o Isolator 1.5		campione coagulato; campione in provetta con EDTA
Prelievi biotici	≥ 1 g di tessuto		campioni in formalina
Pus	la massima possibile		tamponi senza terreno di trasporto
Sangue	10 ml in provetta con eparina o Isolator	3 a distanza di 30 minuti l'uno dall'altro	sangue coagulato; sangue in provetta con EDTA
Sangue mestruale	alcuni ml, raccolti al 2°-3° giorno del flusso mestruale, in provetta con eparina		sangue coagulato
Urine	la prima urina del mattino (almeno 50 ml), taluni suggeriscono la tecnica del mitto intermedio	3 in giorni consecutivi	urine delle 24 ore; urine da sacca

- Risciacquare la bocca con acqua per limitare la contaminazione con residui di cibo, colluttori o farmaci orali che possano inibire la crescita dei micobatteri.
- Raccogliere il materiale di provenienza polmonare con un colpo di tosse.

### **Espettorato indotto**

Da prelevare qualora il paziente abbia difficoltà a produrre espettorato.

- Far precedere la raccolta da un aerosol con soluzione salina ipertonica (5-10%), sterile (per eliminare la possibilità di contaminazione con micobatteri ambientali presenti nell'acqua).
- Dato che il campione ha aspetto salivare è necessario che il tipo di prelievo sia specificato chiaramente sul contenitore onde evitare che venga considerato non idoneo.

**Broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare, aspirato transtracheale, spazzolatura bronchiale:**

- Non utilizzare per la pulizia del broncoscopio acqua del rubinetto, per evitare contaminazioni dovute alla presenza di micobatteri ambientali.

**Aspirato gastrico**

Da eseguire quando non è possibile raccogliere secrezioni polmonari:

- Neutralizzare immediatamente il pH aggiungendo al campione 100 mg di carbonato di sodio.

**2.1.2 Micobatteriosi extra-polmonari**

**Liquidi cavitari (pleurico, peritoneale, articolare, pericardico):**

- Disinfettare la cute con alcool prima della raccolta con siringa.
- Usare provette con eparina poiché il materiale può contenere fibrinogeno.

**Liquor cefalorachidiano:**

- Prelevare il massimo volume possibile.

**Pus:**

- Disinfettare la cute con alcool prima della raccolta.
- Utilizzare una siringa con ago avvitabile.
- Utilizzare per la raccolta un tampone con terreno di trasporto Amies o Stuarts solo se non è possibile il prelievo con siringa.

**Urine:**

- Raccogliere al mattino almeno 50 ml di urina scartando il primo getto; in alternative prelevare l'urina mediante cateterizzazione o con puntura sovrapubica.
- Non utilizzare la raccolta delle 24 ore o le urine da sacca.

**Feci:**

- Raccoglierne almeno 1 g in un contenitore sterile.
- Per la diagnosi di tubercolosi intestinale si raccomanda l'esecuzione di una biopsia intestinale.

**Prelievi biotici:**

- Raccogliere asetticamente per evitare contaminazione con altri microorganismi.
- Non avvolgere in garza.
- Non immergere in fissativi o conservanti.
- Aggiungere una minima quantità soluzione salina sterile per evitare l'essiccamento di campioni di piccole dimensioni o qualora il campione debba essere spedito.

### **Materiale da lesioni cutanee:**

- Utilizzare per la raccolta un tampone con terreno di trasporto Amies o Stuarts solo se non è possibile eseguire una biopsia o un'agoaspirato,
- Nelle ulcere, raccogliere il campione alla periferia della lesione.

### **Sangue e midollo osseo:**

Rappresentano i materiali d'elezione per la diagnosi delle forme disseminate da MAC in pazienti con AIDS.

- Disinfettare la cute con le stesse modalità delle emocolture tradizionali.
- Effettuare il prelievo con provette chiuse contenenti eparina o SPS nel caso in cui per la coltura si impieghino sistemi che prevedono flaconi specifici (Bactec radiometrico, MB/BacT).
- Effettuare il prelievo con provette Isolator in tutti gli altri casi.
- Non utilizzare provette con EDTA, che può inibire la crescita dei micobatteri,
- Miscelare per inversione la provetta immediatamente dopo il prelievo.

## **2.2 CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI**

I campioni dovrebbero essere processati entro poche ore dal momento del loro arrivo in laboratorio; la conservazione è tuttavia possibile a +4°C per un massimo di 4 giorni, periodo per il quale è preservata la vitalità dei micobatteri.

- Il sangue non deve essere refrigerato.
- Il congelamento dei campioni è da evitare poiché può diminuire la carica dei micobatteri vitali.
- Il trasporto al laboratorio deve essere il più rapido possibile. Per la spedizione si devono seguire le modalità previste dalla Circolare del Ministero della Sanità n°16 del 20/07/94.

## **2.3 IDONEITÀ DEI CAMPIONI**

Campioni pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere processati, segnalando al clinico i motivi del rifiuto. Tali campioni dovrebbero essere tuttavia conservati per almeno 3 giorni per fornire al clinico l'opportunità di richiederne la processazione in via eccezionale in caso di impossibilità di raccogliere un campione adeguato.

I principali criteri di non accettabilità dei campioni sono riportati nella tabella 4.

## **2.4 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

I campioni provenienti dalle basse vie respiratorie non richiedono trattamenti diversi dalla normale decontaminazione; altri tipi di campione necessitano invece di procedure particolari.

### **Prelievi bioptici**

- Ridurre in frammenti minuti con forbici sterili.
- Sospendere i frammenti in soluzione fisiologica ed omogeneizzare utilizzando mortaio e pestello sterili.
- Eseguire lo striscio per l'esame microscopico e seminare direttamente o, in caso di campioni potenzialmente contaminati, previa decontaminazione.

### Feci

- Eseguire, direttamente dal campione, un vetrino per evidenziare eventuali organismi alcol-acido resistenti.
- In caso di positività dell'esame microscopico: sospendere una piccola quantità di materiale in 5 ml di brodo Middlebrook 7H9, omogeneizzare al vortex e decontaminare.

### Aspirato gastrico

- Neutralizzate il pH aggiungendo al campione carbonato di sodio.

### Liquidi cavitari

- Concentrare per centrifugazione (3000 x g per 15 minuti).
- Decantare ed eseguire lo striscio microscopico e la semina direttamente dal sedimento.

### Campioni raccolti con tampone

- Porre il tampone in una provetta con 2 ml di acqua distillata, agitare al vortex per almeno 30 s, recuperare il tampone e scartarlo dopo averlo spremuto contro la parete interna della provetta.
- Concentrare il liquido mediante centrifugazione e seminare il sedimento direttamente o, se proveniente da distretti potenzialmente contaminati, previa decontaminazione.

### Urine

- Centrifugare a 3000 x g per 15 minuti.
- Decantare.
- Eseguire la decontaminazione sul sedimento.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Carr D.T., Karlson A.G., Stilwell G.G. A comparison of cultures of induced sputum and gastric washings in the diagnosis of tuberculosis. 1967. *Majo Clin. Proc.* 42:23-25.
- Damsker B., Bottone E.J. *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from the intestinal tracts of patients with the acquired immunodeficiency syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis. 1985. *J. Infect. Dis.* 151:179-181.
- DuMoulin G.C., Stottmeir K.D. Waterborne mycobacteria: an increasing threat to health. *ASM News.* 1986. 52:525-529.
- Engback H.C., Weis-Bentzon M. Transport of sputum specimens to a central tuberculosis laboratory. 1. Evaluation of routine specimens from Greenland. 2. Experimental work with sputum specimens from Denmark. 1964. *Acta Tuberc. Scand.* 45:89-104.
- Jones F.L.Jr. The relative efficacy of spontaneous sputa, aerosol-induced sputa, and gastric aspirates in the bacteriologic diagnosis of pulmonary tuberculosis. 1965. *Dis. Chest.* 50:403-408.

- Kent P.T., Kubica G.P. Specimen collection and transportation. 1985. In: Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. 21-30. U.S. Department of Health and Human Services. CDC. Atlanta
- Kiehn T.E., Edwards F.F., Brannon P., Tsang A.Y., Maio M., Gold J.W.M., Whimbley E., Wong B., McClatchy J.K., Armstrong D. Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics. 1985. J. Clin. Microbiol. 21:168-173.
- Smithwick R.W. Laboratory manual for acid-fast microscopy. 1976. 3-7. Department of Health, Education, and Welfare. CDC. Atlanta.
- Smithwick R.W., Stratigos C.B. David H.L. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. 1975. J. Clin. Microbiol. 1:411-413.
- Wallace R.J. Nontuberculous mycobacteria and water: a love affair with increasing clinical importance. 1987. Infect. Dis. Clin. North Am. 1:677-686.
- Wallis C.K. Specimen collection and transport. 1994. In: Isemberg H.D. (Ed.). Clinical Microbiology Procedures Handbook. 3.2.1-3.2.6. American Society for Microbiology. Washington.

### 3 ESAME MICROSCOPICO

Claudio Piersimoni

**Principio:**

I micobatteri possiedono una parete cellulare del tutto peculiare ricca di particolari acidi grassi a catena lunga detti acidi micolici. Questa caratteristica differenzia i micobatteri dagli altri microrganismi e rende ragione della loro alcol-acido resistenza. L'esatta natura di questo fenomeno non è ancora completamente definita, tuttavia si ritiene che il fenolo permetta la penetrazione del colorante primario agendo sulla struttura degli acidi micolici. Il colorante viene successivamente trattenuto anche dopo esposizione ad agenti decoloranti quali alcol ed acido. Un colorante di contrasto viene impiegato per meglio evidenziare, rispetto allo sfondo, i bacilli alcol-acido resistenti.

In alternativa ai coloranti classici possono essere impiegati, per evidenziare la alcol-acido resistenza, dei fluorocromi che comportano la lettura dei vetrini col microscopio a fluorescenza. Tali tecniche, consentendo l'osservazione con obiettivo a 40x invece che a 100x, aumentano significativamente la sensibilità dell'esame e rendono più rapida la lettura; esse richiedono tuttavia una maggior esperienza da parte dell'osservatore.

L'esame microscopico per la ricerca dei bacilli alcol-acido resistenti costituisce il test diagnostico più rapido ed economico in micobatteriologia.

#### 3.1 PREPARAZIONE DELLO STRISCIO

**Procedimento:**

- Utilizzare vetrini nuovi e ben sgrassati, opportunamente contrassegnati con i dati identificativi del campione. Se possibile, preparare due vetrini per campione, uno dei quali da utilizzare in caso di rottura, di difetti di colorazione o per conferma di positività dubbie.
- Trasferire una porzione significativa del campione sulla superficie del vetrino utilizzando una ansa o una pipetta. Distribuire il materiale su una superficie di approssimativamente 1.5 x 1.5 cm facendo attenzione che il preparato non risulti eccessivamente spesso.
- Per i campioni concentrati (tramite centrifugazione per 15 min. a 3.000 x g, oppure mediante citocentrifugazione) utilizzare una o due gocce di sedimento, mentre per i campioni non concentrati prelevare una ansata di materiale necrotico o purulento. Per i campioni di liquor cefalo-rachidiano depositare una goccia di sedimento al centro del vetrino, lasciare asciugare all'aria, ripetere questa operazione almeno 3 volte ponendo la nuova goccia sulla precedente una volta che si è asciugata.
- Lasciare asciugare all'aria.
- Fissare i vetrini utilizzando uno dei seguenti metodi:
  - 1) lasciandoli su una piastra riscaldante (65°-75°C) per almeno 2 h.
  - 2) passandoli per non più di 3-4 volte alla fiamma blu o incolore di un becco Bunsen.
  - 3) immergendoli in metanolo assoluto per almeno 1 minuto.

## 3.2 COLORAZIONE

### 3.2.1 Colorazione di Ziehl-Neelsen (carbolfucsina a caldo)

**Reagenti:**

- Carbolfucsina di Ziehl: preparare una soluzione contenente 0.3 g di fucsina basica in 10 ml di etanolo al 95%; aggiungere a 90 ml di una soluzione acquosa di cristalli di fenolo al 4.5%. Stabile a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.
- Decolorante: aggiungere 3 ml di acido cloridrico concentrato a 97 ml di etanolo al 95%. Stabile a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.
- Colorante di contrasto: sciogliere 0.3 g di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata. Stabile a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.

**Procedimento:**

- Coprire il vetrino con carbolfucsina. Scaldare gentilmente il vetrino, fino alla formazione dei primi vapori, passandolo sotto il vetrino la fiamma di un batuffolo di cotone impregnato di alcol. Colorare per 5 minuti, aggiungendo nuovo colorante se necessario.
- Lavare con acqua di fonte.
- Decolorare con acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 sec., finché non v'è più traccia di colorante nel lavaggio con acqua di fonte che segue ad ogni passaggio con decolorante.
- Colorare con blu di metilene per almeno 30 sec.
- Lavare con acqua di fonte.
- Asciugare all'aria ed osservare al microscopio con obiettivo 100x ad immersione. I micobatteri appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo, di colore blu.

### 3.2.2 Colorazione di Kinyoun (carbolfucsina a freddo)

**Reagenti:**

- Carbolfucsina di Kinyoun: preparare una soluzione contenente 4 g di fucsina basica in 20 ml di etanolo al 95%; aggiungere 100 ml di acqua distillata in cui sono stati sciolti a caldo 8 g di fenolo in cristalli. Stabile a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.
- Decolorante: aggiungere 3 ml di acido cloridrico concentrato a 97 ml di etanolo al 95%. Stabile a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.
- Colorante di contrasto: sciogliere 0.3 g di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata. Stabile a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.

**Procedimento:**

- Coprire il vetrino con carbolfucsina. Colorare per 5 minuti.
- Lavare con acqua di fonte.
- Decolorare con acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 sec., finché non v'è più traccia di colorante nel lavaggio con acqua di fonte che segue ad ogni passaggio con decolorante.

- Colorare con blu di metilene per almeno 30 sec.
- Lavare con acqua di fonte.
- Asciugare all'aria ed osservare al microscopio con obiettivo 100x ad immersione. I micobatteri appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore blu.

### 3.2.3 Colorazione con auramina

#### **Reagenti:**

- Auramina: preparare una soluzione contenente 0.1 g di auramina O in 10 ml di etanolo al 95%; aggiungere a 87 ml di acqua distillata in cui sono stati sciolti 3 g di fenolo in cristalli. Stabile al buio in bottiglia scura a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.
- Decolorante: aggiungere 0.5 ml di acido cloridrico concentrato a 100 ml di etanolo al 70%. Stabile a temperatura ambiente per 3 almeno mesi.
- Colorante di contrasto: sciogliere 0.5 g di permanganato di potassio in 100 ml di acqua distillata. Stabile a temperatura ambiente per almeno 3 mesi.

#### **Procedimento:**

- Coprire il vetrino con auramina, colorare per 15 minuti senza riscaldare.
- Lavare con acqua di fonte.
- Decolorare con acido-alcol per 2 minuti.
- Lavare con acqua di fonte.
- Colorare con permanganato di potassio per non più di 2 minuti. Se lasciato agire più a lungo il permanganato di potassio può legarsi all'auramina mascherando così la presenza di eventuali bacilli alcol-acido resistenti.
- Lavare con acqua di fonte.
- Asciugare all'aria ed osservare entro 24 ore al microscopio a fluorescenza con obiettivo da 40x.

I micobatteri appaiono fluorescenti in giallo contro lo sfondo scuro. Si può usare un obiettivo 100x ad immersione per osservare meglio le caratteristiche morfologiche dei micobatteri. Nei casi dubbi si può ricolorare con carbolfucsina il preparato già colorato con auramina.

#### **Limitazioni**

La alcol-acido resistenza non è una proprietà tintoriale esclusiva dei micobatteri. Altri microrganismi, diversi dai micobatteri, possono mostrare vari gradi di alcol-acido resistenza: nocardie, *Rhodococcus*, *Legionella micdadei*, cisti di *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora* spp. Inoltre, mentre i micobatteri a lenta crescita sono stabilmente alcol-acido resistenti, i micobatteri a rapida crescita possono variare nella capacità di trattenere la carbolfucsina dopo decolorazione e spesso non si evidenziano dopo colorazione con auramina.

La ricerca microscopica dei bacilli alcol-acido resistenti è scarsamente sensibile; è doveroso ricordare che la soglia di positività microscopica è di circa 5.000-10.000 bacilli alcol-acido resistenti per ml di materiale patologico; ciò rende ragione della frequenza con cui ad un esame microscopico positivo corrisponde la positività della coltura.

L'esame microscopico non fornisce, ovviamente, alcuna informazione riguardo alla vitalità dei micobatteri osservati; non è quindi eccezionale il reperto, in pazienti sotto terapia, di colture negative da campioni positivi microscopicamente.

**Controllo di qualità**

Controlli positivo e negativo dovrebbero essere inclusi quotidianamente fra i preparati microscopici, allo scopo di verificare la corretta performance delle procedure; verifica tanto più importante quanto minore è il numero di campioni esaminati dal singolo laboratorio. I controlli vanno letti e verificati prima della osservazione microscopica dei campioni clinici. *Escherichia coli* e *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATTC 25177) sono comunemente usati rispettivamente come controllo negativo e positivo. I controlli possono essere preparati a partire da una sospensione dei microrganismi suddetti, di densità pari al n. 1 della scala McFarland. E' sufficiente porre una goccia di ciascuna sospensione sulla superficie di un vetrino, lasciare asciugare all'aria e trattare come un qualsiasi preparato.

**3.3 OSSERVAZIONE MICROSCOPICA**

Esaminare il vetrino senza fretta osservando almeno un centinaio di campi microscopici prima di considerarlo negativo. Adottare inoltre una metodo di lettura che garantisca l'osservazione di una parte significativa del preparato (3 passaggi lungo l'asse maggiore del vetrino oppure 9 lungo l'asse minore). I bacilli alcol-acido resistenti appaiono come lunghi e sottili bastoncini, talvolta ricurvi, isolati o più spesso riuniti a gruppetti. Alcuni possono presentare un aspetto bandeggiato con zone scarsamente colorate o del tutto prive di colore. Alcune specie di micobatteri non tubercolari hanno un aspetto microscopico pleomorfo che può andare dalle forme coccoidi a quelle allungate.

**3.4 REFERTAZIONE**

Se negativo refertare: "Negativo per bacilli alcol-acido resistenti"

Se positivo refertare sulla, scorta dello schema riportato in tabella 5, in base al tipo di colorazione utilizzata ed al numero di bacilli alcol-acido resistenti presenti nei campi microscopici osservati.

**Tabella 5. Schema di refertazione dell'esame microscopico**

Colorazione con:		Referto
Carbolfucsina (100x)	Auramina (40x)	
1-2/ vetrino	1-2/ 70 campi	rari bacilli alcol-acido resistenti (ripetere)
1-9/ 100 campi	2-18/ 50 campi	+
1-9/ 10 campi	4-36/ 10 campi	++
1-9/ campo	4-36/ campo	+++
>9 / campo	> 36/ campo	++++

**BIBLIOGRAFIA**

- o Cernoch P.L., Enns R.K., Saubolle M.A., Wallace. R.J.Jr. Cumitechs 16A, laboratory diagnosis of the mycobacterioses. 1994. Coordinating ed. Weissfeld A.S. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- o David H., Lévy-Frébault V., Thorel M.F. Recherche de mycobacteries par examen au microscope. 1989. In: Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. 21-28. Institut Pasteur. Paris.
- o Della-Latta P., Weitzman I. Acid-fast procedures. 1998. In: Isemberg H.D. (Ed.) Essential procedures for clinical microbiology. 176-178. American Society for Microbiology. Washington D.C.

- Erbesole, L.L. Acid-fast stain procedures. 1992. In: Isemberg H.D. (Ed.), Clinical microbiology procedures handbook. 3.5.1-3.5.11. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Mandler F., Peona V. Metodiche di laboratorio. 1987. In: Micobatteriosi e micobatteri non tubercolari. 39-85. Masson Italia Editori S.p.A. Milano.
- Nolte F.S., Metchok B. Mycobacterium. 1995. In: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M., Tenover F.C., Tenover R.H. (Ed.). Manual of clinical microbiology. 400-437. ASM Press. Washington D.C.

## 4 ESAME COLTURALE

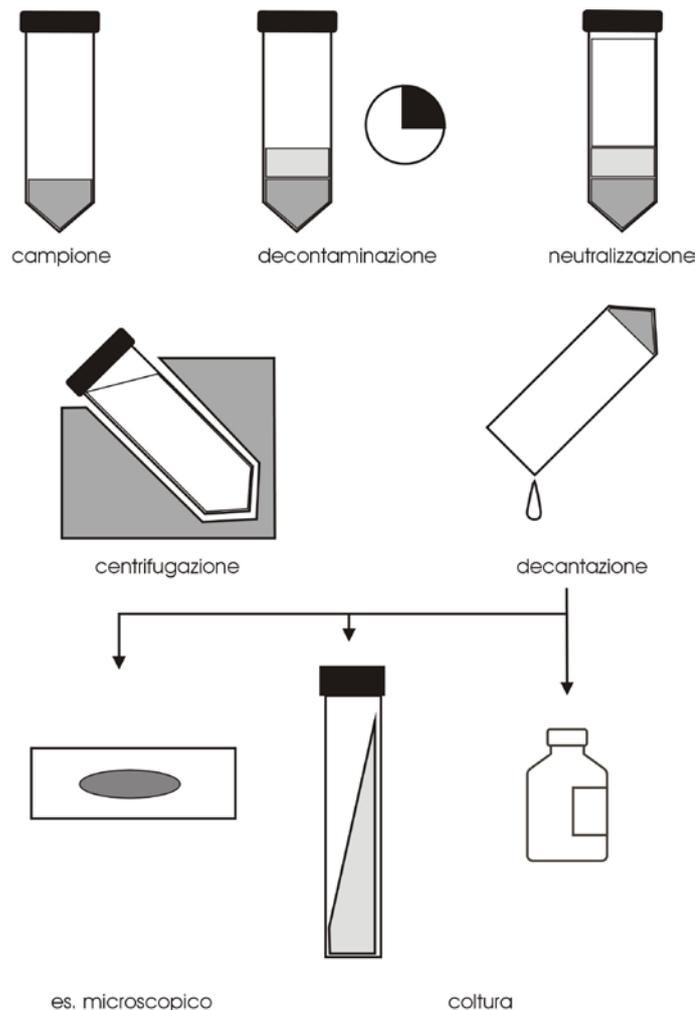
M. Teresa Mascellino

### 4.1 DECONTAMINAZIONE

**Principio:**

I campioni biologici che normalmente contengono flora batterica necessitano di decontaminazione prima della semina per la ricerca dei micobatteri. La decontaminazione ha lo scopo di eliminare la crescita della flora batterica associata e di fluidificare i materiali ricchi di muco, quali gli escreti. La spiccata resistenza dei micobatteri ad acidi e basi forti permette loro di resistere al trattamento decontaminante mentre gli altri batteri eventualmente presenti vengono rapidamente uccisi. Dopo il trattamento gli acidi o gli alcali impiegati per la decontaminazione vengono neutralizzati ed il campione viene centrifugato ad alta velocità per concentrare i micobatteri.

I campioni in cui non è normalmente presente flora batterica, come il liquido cefalorachidiano, il sangue e i liquidi cavitari non necessitano di decontaminazione. Analogamente non vengono normalmente decontaminati: urine prelevate asetticamente, campioni chirurgici e biopsie. I tessuti devono essere tagliati in pezzi con forbici sterili e omogeneizzati.



**Figura 1. Decontaminazione con metodica NALC-NaOH**

Numerose sono le sostanze impiegate per la decontaminazione, fra quelle usate più frequentemente meritano una citazione l'idrato di sodio, il laurilsofato ed il cloruro di benzalconio; per alcune di esse esistono tuttavia delle incompatibilità, sia per la semina su terreni a base di agar che per l'esecuzione delle tecniche di amplificazione. Il sistema che impiega N-acetil-L-cisteina (NALC) e idrato di sodio può essere impiegato con i più svariati tipi di terreno ed è universalmente considerato il metodo di riferimento (figura 1). L'acetil-cisteina è un agente mucolitico che ha la funzione di fluidificare la matrice mucosa dei campioni biologici; la decontaminazione vera e propria è invece operata dall'idrato di sodio. L'impiego dell'agente mucolitico consente l'uso di concentrazioni ridotte del decontaminante evitando che questo possa essere lesivo anche sui micobatteri.

**Reagenti:**

- Soluzione stock di idrato di sodio/citrato di sodio composta, in parti uguali, da una soluzione acquosa 0,1 M di citrato di sodio e da una soluzione acquosa al 4% di idrato di sodio. Deve essere autoclavata a 121°C per 15 minuti e conservata preferibilmente a 4°C.
- Soluzione di lavoro NALC/idrato di sodio/citrato di sodio da preparare, immediatamente prima dell'uso, aggiungendo 0,5 g di acetilcisteina a 100 ml di soluzione idrato di sodio/citrato di sodio. Tale miscela non può essere conservata per più di 24 h.
- Tampone fosfato 0,067 M a pH 6,8.
- Soluzione allo 0,2% della frazione V di albumina bovina. La soluzione di lavoro viene preparata diluendo 1/10 una soluzione stock di albumina bovina al 2%. In alternativa alla soluzione di albumina possono essere impiegate soluzione fisiologica (soluzione sterile di cloruro di sodio allo 0,85%) o acqua distillata sterile.

**Procedimento:**

- Nel provettone (da 50 ml con tappo a vite) che contiene un massimo di 10 ml di campione aggiungere un uguale volume della soluzione NALC/idrato di sodio/citrato di sodio preparata di fresco.
- Agitare il provettone al vortex per non più di 30 s e lasciarlo a temperatura ambiente per 15 minuti.
- Aggiungere al provettone tampone fosfato fino al volume di 50 ml e mescolare per inversione.
- Centrifugare il provettone a  $\geq 3.000 \times g$  per 15-20 min.
- Decantare il supernatante ed eseguire dal sedimento lo striscio per l'esame microscopico.
- Sospendere il sedimento rimanente in 1-2 ml di soluzione fisiologica o di acqua distillata o di albumina allo 0.2%.
- Inoculare la sospensione nei terreni di coltura appropriati.

**Controllo di qualità:**

Per controllare la capacità decontaminante di ciascun nuovo stock di reagenti decontaminare 4-6 campioni di espettorato, concentrarli per centrifugazione ed inocularli sia in piastre di agar-

sangue, sia su terreni per micobatteri. Solo rarissime colonie dovrebbero crescere dopo 24-48 h di incubazione a 37°C.

E' necessario registrare la percentuale dei campioni clinici contaminati. Sono considerate accettabili percentuali comprese fra il 3 al 5%. Se la percentuale di contaminazioni è al di sotto del 3%, il processo di decontaminazione è troppo energico, se invece supera il 5% il decontaminante è troppo debole o la fluidificazione è incompleta.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Kent P. T., Kubica G.P. Digestion-decontamination procedures. 1985. In: Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. 36-46. U.S. Department of Health and Human Services. C.D.C. Atlanta.
- Kubica G.P., Dye W.E., Cohn M.I., Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. 1963. Am. Rev. Respir. Dis. 87:775-779.
- Kubica G.P., Kaufmann A.J., Dye W.E. Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria. 1964. Am. Rev. Respir. Dis. 84: 284-286.
- Nolte F.S., Metchock B. *Mycobacterium*. 1995. In: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover R.H. (Ed.). Manual of clinical microbiology. 400-437. ASM Press. Washington D.C.
- Ratnam S., March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. 1986. J. Clin. Microbiol. 23:582-585.

## 4.2 COLTURA SU TERRENI SOLIDI

I terreni di coltura solidi possono avere come base l'uovo o l'agar e possono essere distinti in terreni non selettivi e terreni selettivi.

**Terreni non selettivi:** Il più comune terreno di coltura a base di uovo è il terreno di Lowenstein-Jensen; un certo impiego trovano, in varie realtà, il terreno di Petragnani, lo IUTM, il Coletsos, il Gottsacker e il terreno della American Thoracic Society (ATS). Il Lowenstein-Jensen ha un contenuto di verde malachite, e quindi un'attività inibente sulla flora associata, intermedio fra il terreno di Petragnani, ad alta attività inibente, ed il terreno ATS, in cui la concentrazione di verde di malachite è minore. Lo IUTM differisce dal Lowenstein Jensen esclusivamente per l'assenza di fecola di patata; Coletsos e Gottsacker contengono anche piruvato e risultano particolarmente adatti alla coltura del *Mycobacterium bovis*. I terreni a base di uovo sono normalmente confezionati a becco di clarino, in provette col tappo a vite.

I terreni a base di agar sono: il Middlebrook 7H10 ed il Middlebrook 7H11 i quali contengono sali, vitamine, cofattori, acido oleico, albumina, destrosio e catalasi. Il terreno 7H11 differisce dal 7H10 in quanto contiene idrolizzato di caseina (sostanza che si è dimostrata utile per aumentare la resa e la velocità di crescita dei micobatteri resistenti all'isoniazide) e per il contenuto in verde di malachite. I terreni a base di agar possono essere confezionati in provette a becco di clarino o in piastre di Petri. Particolare cura dovrebbe essere rivolta alla preparazione e alla conservazione di questi terreni, infatti la loro esposizione a forti sorgenti luminose o il mantenimento degli stessi a 4°C per più di 4 settimane può provocarne il deterioramento con conseguente liberazione di formaldeide che ha azione inibente sulla crescita dei micobatteri.

**Terreni selettivi:** L'uso di terreni addizionati con antibiotici può aumentare in maniera sostanziale la possibilità di isolare micobatteri dai campioni pesantemente contaminati. Il terreno di Gruft è costituito da Lowenstein-Jensen addizionato con penicillina ed acido nalidixico; altri terreni selettivi contengono cicloeximide, lincomicina e acido nalidixico che consentono il controllo dei contaminanti sia batterici che fungini. Il terreno selettivo 7H11 di Mitchison contiene come sostanze inibitrici carbenicillina, polimixina B, trimetoprim e amfotericina B; e la stessa miscela di antibiotici (PACT) si ritrova anche in un terreno selettivo a base di Lowenstein Jensen.

### **Principio:**

Su terreni solidi idonei i micobatteri si moltiplicano dando luogo a colonie visibili ad occhio nudo.

### **Reagenti:**

Una coppia di terreni di coltura.

### **Procedimento:**

Seminare circa 0,1 ml (2-3 gocce) di campione opportunamente decontaminato e/o concentrato, sulla superficie di ciascun terreno solido. Alcuni consigliano di effettuare la semina anche con una diluizione 1/10 del campione per ridurre l'effetto di eventuali sostanze tossiche e per consentire una più accurata visualizzazione e conta delle colonie. Incubare a temperatura compresa fra 35 e 37°C; l'incubazione a temperature inferiori (25-33°C) è raccomandata per i campioni di origine cutanea. L'incubazione dei terreni in atmosfera contenente CO<sub>2</sub> in concentrazione compresa fra il 5 ed il 10% è indispensabile per i terreni di Middlebrook 7H10 e 7H11 e favorisce lo sviluppo dei micobatteri anche sui terreni all'uovo. La stimolazione massima della crescita da parte della CO<sub>2</sub> si verifica nel periodo compreso tra il 4° ed il 10° giorno di incubazione. I terreni distribuiti a becco di clarino vengono incubati in posizione inclinata in modo che il materiale ne ricopra per intero tutta la superficie, il tappo lasciato allentato

permetterà l'evaporazione della parte liquida dell'inoculo. Dopo una settimana circa, quando i terreni saranno ben asciutti, il tappo dovrà essere stretto e l'incubazione delle provette potrà proseguire in posizione verticale. I terreni distribuiti in piastre vengono incubati all'interno di sacchetti di polietilene permeabili alla CO<sub>2</sub> che ne evitano l'essiccamento. L'incubazione deve essere protratta per almeno 6 settimane; il prolungamento fino ad 8 settimane è comunque raccomandato.

Ispezionare i terreni di coltura una volta alla settimana avvalendosi, per i terreni in piastra a base di agar, anche dell'ausilio del microscopio, a piccolo ingrandimento.

Verificare la alcol-acido resistenza delle colonie eventualmente cresciute sui terreni di coltura eseguendo un preparato microscopico e discriminando così la crescita micobatterica dalle contaminazioni.

I terreni di Middlebrook, essendo trasparenti, permettono un più precoce rilevamento della crescita rispetto ai terreni all'uovo, ciò anche grazie alla presenza di biotina e catalasi che favoriscono la ripresa dei batteri danneggiati eventualmente presenti nei campioni clinici. Tali terreni consentono, ad un osservatore esperto, anche una identificazione presuntiva del *Mycobacterium tuberculosis* esaminando al microscopio le caratteristiche morfologiche delle microcolonie. Allo stesso modo è possibile distinguere le colonie trasparenti (tipo virulento) da quelle opache (tipo non virulento) presenti nel complesso *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*.

Benché i terreni all'agar permettano una più precoce evidenziazione dei micobatteri, il Lowenstein-Jensen, dopo incubazione prolungata, può dare un maggior numero di risultati positivi. I risultati migliori si ottengono impiegando entrambi i tipi di terreni solidi.

#### **Controllo di qualità:**

La fertilità di ogni nuovo lotto di terreno di coltura, sia preparati artigianalmente in laboratorio che pronto per l'uso, dovrebbe essere testata con ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* complex e *Mycobacterium fortuitum*.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Beam E.R., Kubica G.P. Stimulatory effect of CO<sub>2</sub> on the primary isolation of tubercle bacilli on agar containing medium. 1968. Am. J. Clin. Pathol. 50:395-397.
- Damato J.J., Collins M. T., Rothlanf M. V., McClatchy J.K. Detection of mycobacteria by radiometric and standard plate procedures. 1983. J. Clin. Microbiol. 17:1066-1073.
- Kubica G.P. Gross W.M., Hawkins J.E., Sommers H.M., Vestal A.L., Wayne L.G. Laboratory services for mycobacterial diseases. 1975. Am. Rev. Respir. Dis. 112:773-787.
- McClatchy J.K., Waggoner R.F., Kanes W., Cernick M.S., Bolton T.L. Isolation of mycobacteria from clinical specimens by use of selective 7H11 medium. 1976. Am. J. Clin. Pathol. 65:412-415.

## 4.3 COLTURA SU TERRENI LIQUIDI

I terreni liquidi, pur consentendo crescite più precoci ed essendo più sensibili rispetto ai terreni solidi, sono stati considerati a lungo di scarsa utilità per la ricerca dei micobatteri andando incontro con estrema facilità a contaminazioni. Il più noto, il Middlebrook 7H9, contiene sali, vitamine, cofattori, albumina, catalasi, glicerolo e destrosio; la presenza di Tween, sostanza tensioattiva, vi permette la crescita dispersa dei micobatteri.

Recentemente, grazie all'impiego di miscele di antibiotici che permettono di contenere entro livelli accettabili il tasso di contaminazione, i terreni liquidi hanno trovato largo impiego sia come tali che abbinati a terreni solidi nel sistema bifasico. Attualmente l'associazione di un terreno liquido ai consueti terreni solidi è considerata indispensabile per un corretto esame colturale.

### 4.3.1 Sistema MGIT

#### **Principio**

Sul fondo della provetta, all'interno di un film di silicone, è presente un composto fluorescente (complesso metallico di rutenio), sensibile alle variazioni della tensione di ossigeno, che funge da sistema rivelatore. L'elevato contenuto di ossigeno del terreno non inoculato ne annulla completamente la fluorescenza che tuttavia torna a manifestarsi non appena la quantità di ossigeno si riduce, ad esempio a causa della respirazione, nel medium, di micobatteri metabolicamente attivi. La fluorescenza è facilmente evidenziabile in presenza di luce ultravioletta.

#### **Reagenti**

- Provetta di terreno (BBL MGIT, Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton Dickinson).
- Arricchimento (OADC BBL MGIT, Becton Dickinson).
- Miscela di antibiotici (PANTA BBL MGIT, Becton Dickinson).

#### **Procedimento**

- Ricostituire la miscela antibiotica con 3 ml di acqua distillata.
- Aggiungere alla provetta 0,5 ml di arricchimento e 0, 1 ml della miscela antibiotica.
- Inoculare la provetta con 0,5 ml di materiale decontaminato e/o concentrato.
- Incubare la provetta, ben chiusa, a 37°C.
- Leggere giornalmente, per 42 giorni, la coltura esponendo la provetta alla luce di una lampada di Wood. Nel caso di campioni positivi la fluorescenza, si manifesta di un colore arancio brillante sul fondo della provetta e sul menisco. Tale fluorescenza viene confrontata con un controllo positivo (provetta contenente soluzione di solfito di sodio allo 0,4% } e con un controllo negativo (tubo MGIT non inoculato }.
- In presenza di fluorescenza eseguire un preparato con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microrganismi sviluppatasi siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

In rari casi la positività della coltura può manifestarsi, in assenza di fluorescenza, con flocculati granulazioni o intorbidamento nel brodo.

### **Controllo di qualità**

Controllare la fertilità di ogni nuovo lotto del terreno o dei supplementi utilizzando ceppi di riferimento di *M. tuberculosis*, *M. kansasii* e *M. fortuitum*.

### **4.3.2 Sistema bifasico Septi-Chek**

#### **Principio**

Il sistema consta di un flacone di brodo in comunicazione con un cilindro contenente un supporto (*slide*) su cui sono stratificati 3 diversi terreni solidi. Nel brodo, seminato col campione in esame, si moltiplicano i micobatteri eventualmente presenti; sui terreni dello slide, che vengono inoculati capovolgendo periodicamente il sistema in modo che il brodo li bagni completamente, si possono sviluppare colonie isolate. La presenza fra i terreni del sistema di un terreno di uso generale (agar cioccolato) permette il rilevamento precoce delle contaminazioni.

#### **Reagenti**

- Flacone di brodo (Septi-Chek AFB Mycobacteria Culture Bottle, Becton Dickinson)
- Supporto sigillato comprendente tre terreni: Middlebrook 7H11, un terreno a base di uovo e agar cioccolato (Septi-Chek AFB slide, Becton Dickinson).
- Supplemento composto da una miscela antibiotica e da vari arricchimenti (Septi-Chek AFB Mycobacteria Culture Supplement, Becton Dickinson).

#### **Procedimento**

- Ricostituire il supplemento con 9 ml di acqua distillata sterile.
- Aggiungerne 1 ml di supplemento al flacone.
- Inoculare il flacone con 0,5-1 ml di materiale decontaminato e/o concentrato.
- Togliere il tappo bianco del cilindro contenente lo slide ed avvitare il cilindro sul collo del flacone. Tale operazione deve essere eseguita rapidamente per far sì che una parte della CO<sub>2</sub> contenuta nel cilindro rimanga all'interno del sistema per stimolare la crescita dei micobatteri.
- Capovolgere il sistema e ruotarlo lentamente in modo che i terreni solidi vengano bagnati completamente dal brodo. Alcuni consigliano di eseguire tale operazione solo a partire dal 2°-3° giorno di incubazione per consentire una più efficace azione degli antibiotici sull'eventuale flora contaminante.
- Incubare per 8 settimane a 37°C, in posizione verticale-
- Ispezionare il flacone, giornalmente durante la prima settimana e settimanalmente nelle 7 settimane seguenti, per rilevare la presenza di colonie sui terreni solidi. Dopo ogni lettura, in assenza di colonie, capovolgere il flacone in modo che il brodo bagni completamente i terreni solidi.
- In presenza di colonie eseguire un preparato atto ad evidenziare la alcol-acido resistenza per verificare se i microorganismi sviluppatasi siano micobatteri o contaminanti.

In rari casi la positività della coltura può manifestarsi soltanto nel brodo con flocculati granulazioni o intorbidamento.

### **Controllo di qualità**

Controllare la fertilità di ogni nuovo lotto di terreno o di supplemento utilizzando ceppi di riferimento di *M. tuberculosis*, *M. kansasii* e *M. fortuitum*.

### **4.3.3 Sistema MB Redox**

#### **Principio**

I micobatteri crescono in terreno liquido di Kirchner formando piccoli fiocchi che sedimentano al fondo della provetta (è il caso del *M. tuberculosis*) o provocando intorbidamento uniforme (*M. avium* complex e micobatteri a crescita rapida). La differenziazione della crescita micobatterica dalle particelle normalmente presenti nel materiale usato per l'inoculo e da eventuali contaminanti è resa possibile dalla presenza nel terreno di sali di tetrazolio che vengono ridotti a formazano dai micobatteri in crescita; il formazano, insolubile e colorato (rosa-violetto) si fissa alla superficie delle colonie micobatteriche rendendole facilmente riconoscibili.

#### **Reagenti**

- Terreno di coltura (MB Redox, Biotest). Si tratta di una modificazione del terreno di Kirchner contenente vari arricchimenti, sali di tetrazolio, e una miscela antibiotica composta da polimixina B, amfotericina B, carbenicillina e trimetoprim. Il medium è distribuito in provette (4 ml) con tappo a vite fornito di setto di gomma per l'eventuale inoculo con siringa.

#### **Procedimento**

- Inoculare la provetta con 0,1-0,5 ml di materiale decontaminato e/o concentrato.
- Incubare per 8 settimane a 37°C, in posizione verticale-
- Ispezionare le provette, almeno due volte a settimana osservando il sedimento prima e dopo agitazione.
- In presenza di fiocchetti rosa-violetto, depositati sul fondo della provetta, o di colorazione uniforme del brodo, eseguire un preparato atto ad evidenziare la alcol-acido resistenza per verificare se i microorganismi sviluppatasi siano micobatteri o contaminanti. Eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

### **Controllo di qualità**

Controllare la fertilità di ogni nuovo lotto di terreno utilizzando ceppi di riferimento di tre diverse specie di micobatteri.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Badak P.Z., Kiska D.I., Setterquist S., Hartley C., O'Connell M.A., Hopfer R.I. Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. 1996. J. Clin. Microbiol. 34:2236-2239.
- Cornfield D.B., Beavis K.G., Greene J.A., Bojak M., Bondi J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the Mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture system. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:2068-2071.

- Naumann I., Jaeger H., Lang E., Lehn N., Linde H.J., Oros H., Pausch G., Poppinger J., Schwarz A., Vilsmeier S., Reischl U. Evaluation of MB Redox -Comparison of a new liquid medium with solid media and the BACTEC 460. 1997. J. Lab. Med. 21:31-34.
- Sewell D.I., Rashad A.I., Rourke W.J., Poor S.I., McCarthy J.A.C., Pfaller M.A. Comparison of the Septi-Chek AFB and BACTEC systems and conventional culture for recovery of mycobacteria. 1993. J. Clin. Microbiol. 31:2689-2691.
- Tortoli E., Mandler F., Tronci M., Penati V., Sbaraglia G., Costa D., Montini G., Predominato M., Riva R., Passerini Tosi C., Piersimoni C., Urbano P. Multicenter evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with the BACTEC radiometric method, BBL biphasic growth medium and Lowenstein-Jensen medium. Clin. Microbiol. Infect. 1997. 3:468-473.

## 4.4 COLTURA SU TERRENO RADIOMETRICO (BACTEC)

### Principio

La crescita dei micobatteri sui terreni di coltura è molto lenta e si manifesta solo dopo alcune settimane di incubazione. Il sistema radiometrico Bactec, mettendo in evidenza il prodotto del metabolismo microbico (CO<sub>2</sub>) piuttosto che la crescita visibile, abbrevia i tempi di rilevamento dei micobatteri nei campioni clinici. Il terreno di coltura impiegato nel sistema radiometrico, contenuto in flaconcini sigillati, contiene acido palmitico marcato con <sup>14</sup>C cosicché risulterà radiomarcata anche la CO<sub>2</sub> prodotta dal metabolismo micobatterico. Un apposito apparecchio prelevando con un ago, attraverso il setto di gomma, il gas contenuto nel flaconcino è in grado di rilevare, mediante un apposito beta-counter, la presenza di radioattività e di segnalarla quantitativamente mediante un indice di crescita (GI, growth index) che costituisce la spia della positività della coltura.

### Reagenti

- Un flacone di brodo (Bactec 12B, Becton Dickinson). Si tratta di una variante del brodo Middlebrook 7H9 contenente ac. palmitico radiomarcato.
- Miscela di antibiotici contenente polimixina B, amfotericina B, acido nalidixico, trimethoprim, azlocillina (PANTA Plus kit, Becton Dickinson).
- Liquido di ricostituzione contenente poli-ossietilene stearato che incrementa lo sviluppo dei micobatteri, specialmente del *M. tuberculosis* complex (Reconstituting fluid, Becton Dickinson).
- Liquido di diluizione (Diluting fluid, Becton Dickinson).

### Procedura

- Leggere un flaconcino di Bactec 12B con l'apparecchio Bactec 460TB per verificare che il livello di radioattività di fondo non sia troppo elevato. Scartare i flaconcini con GI >20.
- Ricostituire la miscela di antibiotici PANTA con 5 ml di liquido di ricostituzione.
- Aggiungere al flaconcino 0,1 ml di miscela di antibiotici.
- Usando una siringa monouso da 1 ml con ago fisso inoculare il flaconcino con 0,5 ml di campione decontaminato e/o concentrato.
- Disinfettare il setto di gomma del flaconcino con un disinfettante fenolico e successivamente con alcol.
- Incubare il flaconcino a 37°C.
- Leggere il flaconcino con l'apparecchio Bactec 460TB, bisettimanalmente nelle prime due settimane di incubazione e settimanalmente nelle quattro settimane successive. Sottoporre a lettura giornaliera, con l'apparecchio Bactec, tutti i flaconcini il cui GI risulti ≥10.
- Al momento del raggiungimento di un GI ≥100 eseguire un preparato atto ad evidenziare l'alcol-acido resistenza con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microorganismi sviluppatisi siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

### **Controllo di qualità**

La fertilità di ciascun lotto di terreni Bactec 12B deve essere controllata con un ceppo di collezione di *M. tuberculosis*. L'apparecchio Bactec deve essere controllato giornalmente utilizzando l'apposito Performance Test Kit (Becton Dickinson).

La rigorosa disinfezione del setto di gomma, nonché la sostituzione giornaliera degli aghi dell'apparecchio ed il controllo del fornellino di sterilizzazione del medesimo sono indispensabili per evitare la possibilità di contaminazioni dovute a trascinamento da un flacone positivo al successivo.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Morgan M.A., Horstmeier C.D., De Young D.R., Roberts G.D. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. 1983. J. Clin. Microbiol. 18:384-388.
- Roberts G.D., Goodman N.L., Heifets L., Larsh H.W., Lindner T.H., McClatchy J.K., McGinnis M.R., Siddiqi S.H., Wright P. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. 1983. J. Clin. Microbiol. 18:689-696.
- Siddiqi S.H. Bactec TB system. Product and procedure manual, revision D. 1995. Becton Dickinson Diagnostic Instruments System. Towson.
- Takahashi H., Foster V. Detection and recovery of mycobacteria by a radiometric procedure. 1983. J. Clin. Microbiol. 17:380-381.
- Wilson M.L., Stone B.L., Hildred M. V. Reves R.R. Comparison of recovery rates for mycobacteria from Bactec 12B vials, Middlebrook 7H11 selective and Lowenstein-Jensen slants in a public health mycobacteriology laboratory. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:2516-2518.

## 4.5 COLTURA CON SISTEMI AUTOMATICI NON RADIOMETRICI

Recentemente sono stati messi a punto vari sistemi di coltura automatizzati che utilizzano terreni liquidi e rilevano lo sviluppo batterico in base alle variazioni di determinati parametri metabolici. Si tratta di sistemi in grado di rilevare variazioni di pressione (il metabolismo dei micobatteri è caratterizzato dalla produzione di gas), produzione di CO<sub>2</sub> o consumo di ossigeno (entrambi caratteristici del metabolismo aerobio dei micobatteri). I terreni liquidi sono addizionati con miscele di antibiotici; le variazioni del parametro in esame all'interno del terreno vengono monitorizzate ad intervalli regolari da apparecchi automatici che segnalano la positivizzazione della coltura sulla base di complessi algoritmi.

Tali sistemi permettono di accorciare i tempi di positivizzazione e di ottenere una più elevata sensibilità in confronto alle colture su terreni solidi.

### 1.5.1 MB/BacT

#### *Principio*

Il terreno liquido è contenuto in un flacone sigillato che presenta sul fondo un sensore che vira di colore all'aumentare della concentrazione di CO<sub>2</sub>. I flaconi inoculati vengono alloggiati in apposite celle dello strumento incubatore-lettore in cui l'intensità di un raggio luminoso riflesso dal sensore di CO<sub>2</sub> viene misurata da una cellula fotoelettrica. Le variazioni di tale intensità, dovute al viraggio di colore del sensore e, in ultima analisi, alla produzione di CO<sub>2</sub> costituiscono il segnale utilizzato dallo strumento per individuare le colture positive.

#### *Reagenti*

- Flacone contenente 10 ml di brodo (MB/BacT Process Bottle, Organon Teknika). Il brodo è una variante del Middlebrook 7H9.
- Miscela di antibiotici contenente amfotericina B, azlocillina, acido nalidixico, polimixina B e trimetoprim (Kit M.A.S., Organon Teknika).
- Supplemento ( MB/BacT Enrichment Fluid, Organon Teknika).

#### *Procedura*

- Aggiungere al flacone di brodo 1 ml di supplemento.
- Ricostituire la miscela di antibiotici con 10 ml dell'apposito fluido di ricostituzione.
- Aggiungere al flacone di brodo 0,5 ml della miscela di antibiotici.
- Inoculare il flacone con 0,5 ml di campione decontaminato e/o concentrato. Introdurre il flacone nell'apparecchio.
- Sui flaconi segnalati dall'apparecchio come positivi eseguire un preparato atto ad evidenziare la alcol-acido resistenza con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microorganismi sviluppatasi siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

Il sistema MB/BacT dispone anche di bottiglie (MB/BacT Blood Culture Bottle, Organon Teknika) inoculabili direttamente con 5 ml di sangue intero.

### **Controllo di qualità**

La fertilità di ciascun lotto di terreni deve essere controllata con un ceppo di collezione di *M. tuberculosis*.

#### **4.5.2 Bactec 9000/F MB**

##### **Principio**

Il terreno liquido è contenuto in una bottiglia che, una volta inoculata, viene alloggiata in una apposita cella dello strumento agitatore-incubatore-lettore. Sul fondo della bottiglia, all'interno di una matrice, è presente un sensore fluorescente sensibile alle variazioni di tensione di ossigeno.

La diminuzione di ossigeno determinata, all'interno del terreno, dallo sviluppo dei micobatteri determina l'emissione di fluorescenza rilevata dallo strumento e segnalata come positività della coltura.

##### **Reagenti**

- Bottiglia di terreno (Myco/F Sputa, Becton Dickinson). Il medium (40 ml) è una modificazione del brodo Middlebrook 7H9.
- Arricchimento (Supplement/F, Becton Dickinson).
- Miscela di antibiotici (PANTA/F, Becton Dickinson) comprendente polimixina B, amfotericina, acido nalidixico, trimetoprim e azlocillina.

##### **Procedimento**

- Ricostituire la miscela di antibiotici con 10 ml di arricchimento.
- Aggiungere alla bottiglia 2 ml della miscela di antibiotici con arricchimento.
- Inoculare la bottiglia con 0,5-1,5 ml di materiale decontaminato e/o concentrato.
- Inserire la provetta nell'apparecchio.
- Sulle bottiglie segnalate dall'apparecchio come positive eseguire un preparato atto ad evidenziare la alcol-acido resistenza con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microrganismi sviluppati siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

Il sistema Bactec 9000/F MB dispone anche di bottiglie (Myco/F Lytic, Becton Dickinson) inoculabili direttamente con 1-5 ml di sangue intero.

### **Controllo di qualità**

Controllare la fertilità di ogni nuovo lotto di terreno o di supplemento utilizzando ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium fortuitum*.

#### **4.5.3 Bactec MGIT 960**

##### **Principio**

Il terreno liquido è contenuto in una provetta che, una volta inoculata, viene alloggiata in una apposita cella dello strumento incubatore-lettore. Sul fondo della provetta, all'interno di un film di silicone, è presente un composto (complesso metallico di rutenio) sensibile alle variazioni di tensione di ossigeno. La diminuzione di ossigeno determinata, all'interno del terreno, dallo sviluppo dei micobatteri causa l'emissione di fluorescenza rilevata dallo strumento e segnalata come positività della coltura.

### **Reagenti**

- Provetta di brodo (BBL MGIT, Becton Dickinson).
- Arricchimento (OADC BBL MGIT, Becton Dickinson).
- Miscela antibiotica (PANTA BBL MGIT, Becton Dickinson).

### **Procedimento**

- Ricostituire la miscela di antibiotici con 15 ml di arricchimento.
- Aggiungere alla provetta 0,8 ml di supplemento costituito dall'arricchimento e dalla miscela antibiotica.
- Inoculare la provetta con 0,5 ml di materiale decontaminato e/o concentrato..Inserire la provetta nell'apparecchio.
- Sulle provette segnalate dall'apparecchio come positive eseguire un preparato atto ad evidenziare l'alcol-acido resistenza con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microorganismi sviluppatasi siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

### **Controllo di qualità**

Controllare la fertilità di ogni nuovo lotto di terreno o di supplemento utilizzando ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium fortuitum*.

## **4.5.4 ESP Culture System II**

### **Principio**

Il terreno liquido è contenuto in un flacone sigillato che, una volta inoculato, viene alloggiato in una apposita cella dello strumento incubatore-lettore. I flaconi in cui si registrano variazioni di pressione, rilevata da appositi sensori, vengono segnalati come positivi.

### **Reagenti**

- Flacone di terreno (ESP Myco, AccuMed).
- Miscela di antibiotici (ESP Myco AS, AccuMed) contenente polimixina B, azlocillina, fosfomicina, acido nalidixico e amfotericina B.
- Supplemento (ESP Myco GS, AccuMed).
- Connettore ESP (Accumed).

### **Procedura**

- Ricostituire la miscela di antibiotici con 25 ml di acqua distillata sterile.
- Aggiungere al flacone di brodo 1 ml di supplemento e 0,5 ml di miscela di antibiotici.
- Inoculare il flacone con 0,5-1 ml di campione decontaminato e/o concentrato.
- Miscelare per inversione, disinfettare il tappo della bottiglia ed inserire il connettore sul collo della stessa.
- Introdurre il flacone nell'apparecchio.

- Sui flaconi segnalati dall'apparecchio come positivi eseguire un preparato atto ad evidenziare l'alcol-acido resistenza con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microorganismi sviluppatisi siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

### **Controllo di qualità**

La fertilità di ciascun lotto di terreni deve essere controllata con un ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Pfyffer G.E., Welscher H.M., Kissling P., Cieslak C., Casal M.J., Gutierrez J., Rusch-Gerdes S. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:364-368.
- Pfyffer G.E., Cieslak C., Welscher H.M., Kissling P., Rusch-Gerdes S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:2229-2234.
- Rohner P., Ninet B., Metral C., Emler S., Auckenthaler R. Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:3127-3131.
- Tortoli E., Cichero P., Chirillo M.G., Gismondo M.R., Bono L., Gesu G., Simonetti M. T., Volpe G., Nardi G., Marone P. Multicenter comparison of ESP Culture System II with BACTEC 460TB and with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood. 1998. J. Clin. Microbiol. 36: 1378-1381.
- Zanetti S., Ardito F., Sechi L., Sanguinetti M., Molicotti P., Delogu G., Pinna M.P., Nacci A., Fadda G. Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:2072-2075.

## 4.6 EMOCOLTURA SU TERRENO RADIOMETRICO (BACTEC)

### **Principio**

Poiché tra i componenti del terreno di coltura, contenuto in flaconcini sigillati, si trova un substrato (acido palmitico) marcato con  $^{14}\text{C}$ , anche la  $\text{CO}_2$  prodotta dal metabolismo micobatterico a partire da tale substrato risulterà radiomarcata. Un apposito apparecchio prelevando con un ago, attraverso il setto di gomma, il gas contenuto nel flaconcino è in grado di discriminare, a seconda che sia presente o meno radioattività nella fase gassosa le colture positive da quelle negative. La radioattività, misurata da un beta-counter, viene espressa quantitativamente mediante un indice di crescita (GI, *growth index*).

### **Reagenti**

- Flacone di brodo (Bactec 13A, Becton Dickinson) contenente 30 ml di medium. Il terreno, essendo ipotonico, provoca la lisi delle cellule e quindi la liberazione di eventuali microorganismi intracellulari, quali appunto i micobatteri.
- Arricchimento (Bactec Enrichment, Becton Dickinson).

### **Procedimento**

- Aggiungere al flacone di brodo 0,5 ml di arricchimento. Non far leggere preventivamente il flacone dall'apparecchio Bactec, ciò comporterebbe la perdita della pressione negativa che facilita l'iniezione del sangue.
- Inoculare il flacone con 5 ml di sangue intero prelevato utilizzando come anticoagulante SPS o eparina.
- Disinfettare il setto di gomma del flaconcino con un disinfettante fenolico e successivamente con alcol.
- Incubare il flacone a  $37^\circ\text{C}$ .
- Leggere il flaconcino con l'apparecchio Bactec, bisettimanalmente nelle prime due setti- mane di incubazione e settimanalmente nelle sei settimane successive.
- Sottoporre a lettura giornaliera con l'apparecchio Bactec tutti i flaconcini che presentano un GI 20. Nei primi giorni di coltura non è infrequente avere valori di GI > 20 che tendono progressivamente ad annullarsi; si tratta, in tali casi, di un falso segnale dovuto alla  $\text{CO}_2$  liberata dal metabolismo delle cellule ematiche.
- Al momento del raggiungimento di un GI 100 eseguire un preparato con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microorganismi sviluppatisi siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.

### **Controllo di qualità**

La fertilità di ciascun lotto di terreni Bactec 13A deve essere controllata con un ceppo di collezione di *M. tuberculosis*. L'apparecchio Bactec deve essere controllato giornalmente utilizzando l'apposito Performance Test Kit (Becton Dickinson).

## BIBLIOGRAFIA

- Agy M.B., Wallis C.K., Plorde J.J., Carlson L.C., Coyle M.B. Evaluation of four mycobacterial blood culture media: BACTEC 13A, Isolator/BACTEC 12B, Isolator/Middlebrook agar, and a biphasic medium. 1988. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12:303-308.
- Kiehn T.E., Cammarata A. Comparative recoveries of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* from Isolator Iysis-centrifugation and Bactec 13A blood culture system. 1988. *J. Clin. Microbiol.* 26:760-761.
- Landau W., Feczko J., Kaplan A.I. Radiometric detection of mycobacteria in routine blood cultures. 1980. *J. Clin. Microbiol.* 12:477-478.
- Siddiqi S.H. Blood culture for mycobacteria: BACTEC method. 1994. In: Isenberg H.D. (Ed.) *Clinical microbiology procedures handbook*. 3.8.1-3.8.4. American Society for Microbiology. Washington D.C.

## 4.7 EMOCOLTURA COL SISTEMA ISOLATOR

### **Principio**

Il sistema utilizza una provetta contenente una miscela di reagenti in grado di lisare le cellule ematiche senza ledere la vitalità dei microorganismi eventualmente presenti. Il concentrato di microorganismi, ottenuto per centrifugazione, può essere seminato sui terreni più diversi.

Il sistema permette anche la determinazione del numero di microorganismi presenti nel sangue. I composti presenti nella provetta includono SPS (anticoagulante che sopprime la fagocitosi e neutralizza complemento, lisozima ed alcuni antibiotici quali gli aminoglicosidi e le polimixine), saponina (in grado di lisare i globuli rossi e i globuli bianchi) e glicole polipropilenico.

### **Reagenti**

- Provetta di prelievo-concentrazione (Isolator 10 o Isolator 1.5, Oxoid).
- Pipette dedicate e tappo perforatore (Isostat Microbial System, Oxoid).

### **Procedimento**

- Raccogliere nella provetta 10 ml di sangue dalla vena del paziente (1,5 ml per pazienti pediatrici) e miscelare per inversione.
- Centrifugare a 3000 x g per 30 minuti impiegando l'apposita centrifuga con rotore ad angolo fisso.
- Applicare il tappo di perforazione e, utilizzando l'apposita pressa, perforare il diaframma di gomma.
- Introdurre l'apposita pipetta e prelevare il supernatante che verrà quindi scartato. Agitare la provetta Isolator vortexando per 10 s.
- Utilizzando l'apposita pipetta prelevare l'intero sedimento. Seminare il sedimento su idonei terreni di coltura.
- Incubare e leggere i terreni di coltura secondo le modalità consuete.

Il sistema si presta alla semina in tutti i tipi di terreno, solidi e liquidi. Qualora si utilizzino sistemi di coltura automatici, impiegare per l'inoculo del sedimento ottenuto mediante lisi-centrifugazione i flaconi di uso generale essendo quelli specifici per le emocolture (presenti nei sistemi Bactec radiometrico, MB/BacT e Bactec 9000) destinati alla semina con sangue intero.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Agy M.B., Wallis C.K., Plorde J.J., Carlson L.C., Coyle M.B. Evaluation of four mycobacterial blood culture media: BACTEC 13A, Isolator/BACTEC 12B, Isolator/Middlebrook agar, and a biphasic medium 1988. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12:303-308.
- Doern G.V., Westerling J.A. Optimum recovery of *Mycobacterium avium* complex from blood specimens of human immunodeficiency virus-positive patients by using small volumes of Isolator concentrate inoculated into BACTEC 12B bottles. 1994. *J. Clin. Microbiol.* 32:2576-2577.

- Hanna B.A., Walters S.B., Bonk S.J., Tick L.J. Recovery of mycobacteria from blood in Mycobacteria Growth Indicator Tube and Lowenstein-Jensen slant after lysis-centrifugation. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:3315-3316.
- Kiehn T.E., Gold J.W.M., Brannon P., Timberger R.J., Armstrong D. *Mycobacterium tuberculosis* bacteriemia detected by the Isolator lysis-centrifugation blood culture system 1985. J. Clin. Microbiol. 21:647-648.
- Stockman L. Blood culture for mycobacteria: Isolator method. 1992. In: Isenberg H.D. (Ed.) Clinical microbiology procedures handbook. 3.9.1-3.9.5. American Society for Microbiology. Washington.

## 5 IDENTIFICAZIONE

E. Tortoli

### Principio:

E' necessario procedere all'identificazione di tutti i micobatteri cresciuti in coltura. L'identificazione a livello di raggruppamenti di specie è accettabile per i micobatteri facenti parte del *Mycobacterium tuberculosis* complex, del *Mycobacterium avium* complex e del *Mycobacterium terrae* complex.

La differenziazione dei micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex dai micobatteri non tubercolari (MOTT: *mycobacteria other than tuberculosis*) è di fondamentale importanza dal punto di vista clinico e deve essere raggiunta il più rapidamente possibile. In presenza di colonie pigmentate o di micobatteri a crescita rapida l'appartenenza al *Mycobacterium tuberculosis* complex può essere esclusa direttamente ancor prima di ricorrere a qualsiasi approccio identificativo.

I centri che non eseguono l'identificazione devono inviare gli isolati ad un centro di riferimento.

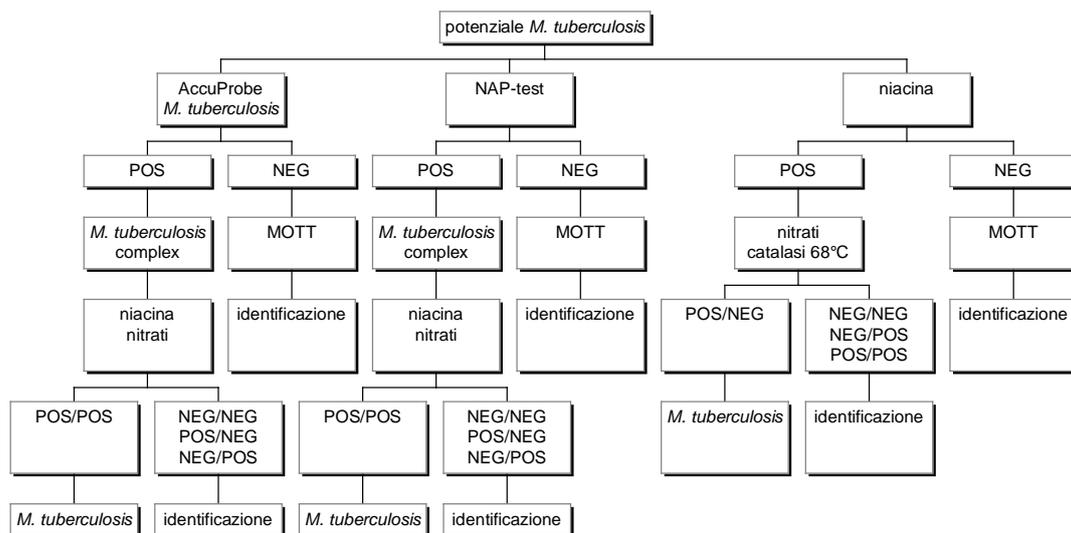


Figura 2. Flow chart per l'identificazione del *M. tuberculosis* utilizzando diverse metodiche

**Osservazioni preliminari:** le colonie cresciute su terreno solido devono essere osservate attentamente per rilevare:

- morfologia (colonie lisce, rugose, trasparenti, opache, ecc.).
- pigmento (non presente, presente fotoindotto, presente non fotoindotto).
- presenza di più di un tipo morfologico.
- velocità di crescita (inferiore o superiore a sette giorni).

Di ciascun tipo di colonie isolate devono essere verificate sempre, con un preparato microscopico, la alcol-acido resistenza e la purezza, a tale fine non possono essere impiegate le colorazioni che usano fluorocromi.

AMCLI quaderni di microbiologia clinica

Tabella 6. Test impiegati per l'identificazione dei micobatteri (i numeri esprimono la percentuale dei casi in cui i test risultano positivi)

Specie	Niacina	Riduzione dei nitrati	Catalasi a 68°C	Catalasi >45 mm	Pigmento al buio	Pigmento alla luce	β-glucosidasi	Idrolisi del Tween 80	Crescita lenta	Crescita a 25°C	Crescita a 45°C	Riduzione del tellurito	Ariolfatasi	Colonie rugose	Ureasi	Crescita in presenza di:					
																MacConkey	NaCl	TCH	Tiacetazone	Idrossilamina	Isoniazide
<i>M. africanum</i>	10	10	0	0	0	0	50	10	100	0	0	0	0	100	90	0	0	10	0	0	0
<i>M. asiaticum</i>	0	0	100	100	0	100	10	100	90	100	0	0	0	10	0	50	0	100	100	82	91
<i>M. avium/intracellulare</i>	0	0	70	19	4	4	10	0	90	100	47	76	0	10	0	24	5	100	98	71	98
<i>M. bovis/M. bovis BCG</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
<i>M. chelonae</i>	3	8	50	97	0	0	10	20	0	96	0	51	90	50	90	90	59	90	90	96	50
<i>M. fallax</i>	10	90	10	50	10	10	50	50	0	90	50	50	10	50	10	10	10	90	90	50	50
<i>M. flavescens</i>	0	100	100	100	100	100	10	100	50	100	17	32	0	50	100	0	100	100	100	0	0
<i>M. fortuitum</i>	7	100	100	98	0	0	85	33	0	90	0	43	100	50	100	100	100	100	100	96	50
<i>M. gastri</i>	0	0	0	0	0	0	90	100	90	100	0	0	0	50	100	16	0	100	9	0	8
<i>M. goodnae</i>	0	0	100	96	100	100	10	91	90	100	0	0	0	0	8	0	0	100	100	35	87
<i>M. haemophilum</i>	0	0	0	0	0	0	50	0	90	90	0	0	0	90	0	0	0	90	50	50	90
<i>M. kansasii</i>	0	97	100	100	0	97	30	100	100	100	0	0	0	50	100	0	0	100	9	11	15
<i>M. malmoense</i>	0	13	25	0	0	0	10	100	90	100	0	50	0	0	71	10	0	100	100	63	100
<i>M. marinum</i>	0	0	100	33	0	90	50	100	50	100	0	0	6	50	100	0	17	100	67	100	83
<i>M. nonchromogenicum</i>	0	11	100	100	0	0	50	100	90	100	0	0	10	50	0	0	0	100	100	100	100

Tabella 6. (continuazione)

Specie	Niacina	Riduzione dei nitrati	Catalasi a 68°C	Catalasi >45 mm	Pigmento al buio	Pigmento alla luce	β-glucosidasi	Idrolisi del Tween 80	Crescita lenta	Crescita a 25°C	Crescita a 45°C	Riduzione del tellurito	Ariolfatasi	Colonie rugose	Ureasi	Crescita in presenza di:					
																MacConkey	NaCl	TCH	Tiacetazone	Idrossilamina	Isoniazide
<i>M. paratuberculosis</i>	10	10	90	10	0	0	50	10	100	50	50	50	50	50	10	50	10	90	50	90	90
<i>M. phlei</i>	0	90	90	90	90	90	50	90	0	50	90	62	0	50	95	0	90	90	90	10	50
<i>M. scrofulaceum</i>	0	18	100	100	100	90	10	0	90	100	0	4	0	0	91	0	0	100	30	85	100
<i>M. shimoidei</i>	0	0	100	0	0	0	50	100	100	10	50	50	0	100	0	0	0	100	100	0	100
<i>M. simiae</i>	37	0	100	89	0	83	10	0	90	100	0	90	0	0	95	50	0	100	100	100	100
<i>M. smegmatis</i>	0	100	50	50	0	0	70	100	0	80	100	90	10	50	90	50	100	90	100	10	50
<i>M. szulgai</i>	0	86	100	100	100	100	70	57	100	100	0	50	10	50	86	0	0	100	100	0	40
<i>M. terrae</i>	0	73	100	100	0	0	50	100	90	100	0	0	0	50	0	3	10	100	100	92	100
<i>M. thermoresistibile</i>	0	90	90	90	100	100	50	90	0	50	100	0	0	10	90	0	100	90	90	0	50
<i>M. triviale</i>	0	0	100	100	0	0	10	67	90	100	0	0	26	90	0	0	100	100	100	100	100
<i>M. tuberculosis</i>	100	98	2	0	0	0	90	70	100	5	0	2	0	100	100	0	0	96	10	0	4
<i>M. ulcerans</i>	0	0	90	0	0	0	50	0	90	90	0	0	0	90	0	50	0	90	50	50	90
<i>M. vaccae</i>	0	90	90	90	90	90	70	90	0	90	10	70	0	0	50	0	63	50	90	10	50
<i>M. xenopi</i>	0	0	100	0	86	86	10	0	90	0	100	10	60	0	0	0	0	100	100	0	0
M. IV gruppo non id.	10	50	90	90	50	50	50	50	0	90	50	50	10	50	90	50	50	90	90	50	50

Per il riconoscimento dei micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex dai MOTT possono essere impiegati i DNA-probe, il NAP test o il test della niacina, secondo la *flow-chart* in figura 2.

Per l'identificazione delle specie diverse dal *Mycobacterium tuberculosis* possono essere impiegati, un pannello di test biochimico-colturali, i DNA-probe (limitatamente alle specie per cui sono disponibili), o la *high performance liquid chromatography* (HPLC) degli acidi micolici della parete.

## 5.1 IDENTIFICAZIONE MEDIANTE TEST BIOCHIMICO-COLTURALI

L'esecuzione di un adeguato numero di test biochimici e colturali permette l'identificazione delle varie specie di micobatteri utilizzando tabelle in cui sono riportati, per ciascuna di esse, i risultati attesi (tabella 6).

### 5.1.1 Arilsolfatasi (3 giorni)

**Principio:** Alcuni micobatteri sono in grado di idrolizzare la fenoftaleina tripotassica a fenoftaleina ma solo per poche specie, per lo più a rapida crescita, tale attività arilsolfatasica è abbastanza intensa da poter essere messa in evidenza entro 3 giorni. La fenolftaleina libera può esser evidenziata, in ambiente alcalino, dallo sviluppo di colore rosso.

**Reagenti:**

- Soluzione stock di fenolftaleina: sciogliere 2,5 g di fenolftaleina disolfato (sale tripotassico) in 50 ml di acqua distillata, sterilizzare per filtrazione e conservare a 2-8°C.
- Carbonato di sodio 1M, non sterilizzare e conservare al buio.
- Terreno: aggiungere a 200 ml di brodo Dubos 2,5 ml della soluzione stock di fenolftaleina; distribuire aliquote di 2 ml in provette con tappo a vite e sterilizzare in autoclave per 10 minuti a 121°C; conservare a 2-8°C.

**Procedimento:**

- Inoculare il terreno con una ansata del micobatterio in esame.
- Incubare la provetta per 3 giorni a 37°C.
- Al termine dell'incubazione aggiungere sei gocce di carbonato.

La comparsa di colorazione rossa nel brodo è indice di positività della reazione.

**Controllo di qualità:**

controllo positivo *Mycobacterium fortuitum*, controllo negativo *Mycobacterium gordonae*.

### 5.1.2 $\beta$ -glucosidasi

**Principio:**

Alcuni micobatteri sono in grado di idrolizzare i  $\beta$ -glucosidi liberando glucosio. Il *p*-nitrofenolo che si libera, per azione della  $\beta$ -glucosidasi, dal *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucoside conferisce alla soluzione una colorazione gialla.

**Reagenti:**

- Substrato: sciogliere 100 µg di 4-nitrofenil-β-D-glucopiranoside in 33 ml di tampone TRIS a pH 7, sterilizzare per filtrazione e distribuire in provette (0,5 ml). La soluzione si conserva a 2-8°C per non più di due settimane.

**Procedimento:**

- Inoculare una provetta di substrato con una ansata del micobatterio in esame.
- Incubare a 37°C per 3 ore.

Il viraggio al giallo del liquido è indice di positività della reazione.

**Controllo di qualità:**

Controllo positivo *Mycobacterium fortuitum*, controllo negativo *Mycobacterium chelonae*.

### 5.1.3 Attività catalasica

**Principio:**

Tutti i micobatteri possiedono la catalasi; esistono tuttavia due diversi tipi di tale enzima, uno termoresistente ed uno che viene inattivato dal trattamento a 68°C per 20 minuti. In presenza di acqua ossigenata la catalasi libera ossigeno riconoscibile dallo sviluppo di bollicine. Alcuni ceppi di *Mycobacterium avium* e di *Mycobacterium chelonae* possono presentare attività catalasica modesta che può non risultare rilevabile.

Esistono due diversi test per la catalasi, il primo ne evidenzia la termoresistenza, il secondo permette di valutarne la quantità.

**Reagenti:**

**a) Termoinattivazione catalasica**

- Tampone fosfato 0,067 M (pH 7) sterilizzato in autoclave per 10 minuti a 121°C.
- Soluzione di Tween 80 al 10% in acqua, sterilizzata in autoclave per 10 minuti a 121°C.
- Acqua ossigenata al 30%.
- Miscela, da preparare al momento dell'uso, di Tween 80 al 10% e acqua ossigenata al 30%, in parti uguali.

**b) Catalasi semiquantitativa.**

- Soluzione di Tween 80 al 10% in acqua, sterilizzata in autoclave per 10 minuti a 121°C.
- Acqua ossigenata al 30%.
- Miscela, da preparare al momento dell'uso, di Tween 80 al 10% e acqua ossigenata 30%, in parti uguali.
- Lowenstein-Jensen a cilindro (deeps).

**Procedimento:**

**a) Termoinattivazione catalasica**

- Stemperare in una ciascuna di una coppia di provette, contenenti 0,5 ml di tampone fosfato, un'ansata di colonie del ceppo in esame.
- Incubare una di tali provette in bagnomaria a 68°C per 20 minuti e tenere l'altra a temperatura ambiente.
- Al termine dell'incubazione riportare la provetta a temperatura ambiente e, dopo qualche minuto, aggiungere ad entrambe le provette 0,5 ml della miscela di Tween e acqua ossigenata.

L'attività catalasica è evidenziata dalla comparsa, entro pochi secondi, di una colonna più o meno alta di bollicine alla superficie del liquido. Il mancato sviluppo di bollicine nella provetta incubata a 68°C è indice dell'avvenuta inattivazione termica dell'enzima.

**b) Catalasi semiquantitativa**

- Inoculare un provettone di Lowenstein-Jensen a cilindro con quattro gocce di una diluizione 1/100 di una sospensione del micobatterio in esame con torbidità pari allo standard n. 1 della scala McFarland.
- Incubare il provettone per due settimane, in posizione verticale, mantenendo allentato il tappo.
- Al termine dell'incubazione aggiungere 1 ml della miscela di Tween 80 al 10% e acqua ossigenata al 30%.
- Dopo cinque minuti, misurare l'altezza della colonna di bollicine sviluppatesi.

I micobatteri vengono ripartiti fra forti e deboli produttori di catalasi a seconda che l'altezza della colonna di schiuma sia superiore o inferiore a 45 mm.

**Controllo di qualità:**

Si possono usare come controlli un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis*, la cui catalasi viene inattivata a 68°C ed è quantitativamente modesta (<45 mm), ed un ceppo di *Mycobacterium kansasii*, forte produttore di catalasi (>45 mm) resistente al trattamento termico.

**5.1.4 Test colturali**

Principio: I caratteri colturali più importanti sono la morfologia delle colonie, la velocità di crescita, la capacità di svilupparsi a varie temperature e l'eventuale presenza di pigmento.

**a) Rilevamento delle caratteristiche delle colonie:**

I terreni più indicati sono quelli a base di agar (Middlebrook 7H10 o 7H11) che, se distribuiti in piastra, possono esser osservati a microscopio a piccolo ingrandimento (100x); in genere sono gli stadi iniziali di sviluppo delle colonie quelli che forniscono le indicazioni più utili. Sui terreni suddetti le colonie di *Mycobacterium tuberculosis* hanno un aspetto irregolare, con i bacilli che formano cordoni serpeggianti e con margini frastagliati, la parte interna ha aspetto granulare. Morfologie coloniali particolari sono quelle del *Mycobacterium avium*: rotondeggiante con margini ondulati ed il centro rilevato e del *Mycobacterium xenopi*: circolare con bastoncini apparentemente ramificati che fuoriescono dai margini.

**b) Determinazione di velocità di crescita, temperature di crescita e pigmento:**

**Reagenti:**

- Quattro tubi di Lowenstein-Jensen.

**Procedimento:**

- Inoculare 4 provettoni di Lowenstein-Jensen ciascuno con 4 gocce di una diluizione 1/1000 di una sospensione micobatterica avente una torbidità pari allo standard n. 1 della scala McFarland.
- Incubare uno dei provettoni a 25°C, uno a 45°C ed i due rimanenti a 37°C, dopo aver provveduto ad avvolgerne uno in carta stagnola per tenerlo al riparo dalla luce.
- Osservare settimanalmente i terreni fino alla sesta settimana o fino al momento della comparsa di colonie.

Il terreno incubato a 37°C permette di discriminare i micobatteri a crescita rapida, le cui colonie sono ben visibili entro sette giorni, da quelli a crescita lenta. Il terreno incubato al buio, che viene osservato solo dopo che sul tubo incubato alla luce sono visibili colonie ben sviluppate, permette di apprezzare l'eventuale pigmento: se le colonie presenti sono pigmentate il ceppo deve essere considerato scotocromogeno, in caso contrario la coltura viene esposta alla luce di una lampada per qualche ora e successivamente reincubata per altre 24 ore; in tal modo si distinguono gli stipiti fotocromogeni, che sviluppano il pigmento in seguito a tale esposizione, da quelli non cromogeni.

### 5.1.5 Test di inibizione selettiva

**Principio:**

Con i test di inibizione selettiva è possibile valutare se determinate sostanze, aggiunte ai terreni di coltura, sono in grado di inibire lo sviluppo del ceppo micobatterico in esame. La capacità di svilupparsi o meno in presenza di tali sostanze è una caratteristica che può quindi essere utilizzata a scopo identificativo.

**Reagenti:**

- Lowenstein-Jensen contenente cloruro di sodio al 5%.
- MacConkey senza cristalvioletto (in piastra).
- Lowenstein-Jensen contenente idrazide dell'acido tiofen-carbossilico (5 µg/ml).
- Lowenstein-Jensen contenente tiacetazone (500 µg/ml) o, in alternativa, Middlebrook 7H11 contenente tiacetazone (400 µg/ml).
- Lowenstein-Jensen contenente idrossilamina cloridrato (500 µg/ml) o, in alternativa, Middlebrook 7H11 contenente idrossilamina cloridrato (600 µg/ml).
- Lowenstein-Jensen o, in alternativa, Middlebrook 7H11 contenente isoniazide (1 µg/ml).

**Procedimento:**

- Preparare una diluizione 1/1000 di una sospensione in acqua del micobatterio in esame avente una torbidità pari allo standard n. 1 della scala McFarland.

- Inoculare con 4 gocce della sospensione suddetta tutti i terreni a base di uovo più un terreno di controllo senza additivi; in alternativa, inoculare con 1 goccia tutti i terreni a base di agar più un terreno di controllo senza additivi.
- Inoculare con un'ansa da 10 µl la piastra di MacConkey.
- Incubare a 37°C tutti i terreni: quelli a base di uovo, per 6 settimane, quelli a base di agar, per 3 settimane, il MacConkey per 10 giorni. I terreni agarizzati richiedono un'atmosfera contenente CO<sub>2</sub> al 5-10% e, per evitarne l'essiccamento, devono essere incubati in sacchetti di polietilene permeabili alla CO<sub>2</sub>.

Si considerano non inibiti quei ceppi che, in presenza di una determinata sostanza, danno luogo, entro il tempo di incubazione previsto, a sviluppo di un numero di colonie superiore al 1% di quelle cresciute sul terreno di controllo. La lettura dei terreni a base di uovo si effettua ad occhio nudo mentre per quella dei terreni agarizzati ci si può aiutare osservando, al microscopio a 100x, le piastre capovolte.

#### **Controllo di qualità:**

Lowenstein-Jensen con cloruro di sodio: controllo positivo *Mycobacterium fortuitum* controllo negativo *Mycobacterium kansasii*; MacConkey: controllo positivo *Mycobacterium fortuitum*, controllo negativo *Mycobacterium gordonae*; Lowenstein-Jensen con idrazide dell'acido tiufen-carbossilico: controllo positivo *Mycobacterium kansasii*, controllo negativo *Mycobacterium bovis*; terreno con tiacetazone: controllo positivo *Mycobacterium avium*, controllo negativo *Mycobacterium bovis*; terreno con idrossilamina cloridrato: controllo positivo *Mycobacterium fortuitum*, controllo negativo *Mycobacterium tuberculosis*; terreno con isoniazide controllo positivo *Mycobacterium gordonae*, controllo negativo *Mycobacterium xenopi*.

### **5.1.6 Accumulo di niacina**

#### **Principio:**

Il *Mycobacterium tuberculosis* è l'unica specie che accumuli, in maniera sistematica, la niacina nel terreno di coltura. La niacina si evidenzia su colture fatte sviluppare, ben aerate, su Lowenstein-Jensen fino al raggiungimento di una crescita rigogliosa (almeno 3 settimane).

#### **Reagenti:**

- Strisce reattive TB niacin test strips (Niacin test strips, Becton Dickinson)).

#### **Procedimento:**

- In presenza di colonie confluenti praticare nel terreno, con una pipetta Pasteur, delle incisioni in modo da aumentare la superficie di contatto col liquido di estrazione.
- Aggiungere ad ogni coltura 2,5 ml di acqua distillata sterile.
- Estrarre la niacina incubando overnight a 37°C le colture mantenendole in posizione inclinata in modo che l'acqua ricopra per intero lo *slant*.
- Riportare le provette in posizione verticale e recuperare con una pipetta Pasteur il liquido di estrazione.
- Ripartire il liquido di estrazione fra due provette ed aggiungere ad una di esse la striscia reattiva; la seconda provetta serve da "bianco".

- Leggere dopo 15 minuti: il viraggio al giallo del liquido della provetta contenente la striscia reattiva (l'interpretazione è facilitata dal confronto con il "bianco") è indice di positività.

**Controllo di qualità:**

Come controllo positivo può essere impiegata una coltura di *Mycobacterium tuberculosis* mentre il controllo negativo è reso superfluo dalla presenza del "bianco".

### 5.1.7 Riduzione dei nitrati

**Principio:**

Alcune specie micobatteriche sono capaci di ridurre i nitrati a nitriti.

**Reagenti:**

- Brodo per nitrati sterilizzato per 10 minuti a 121°C.
- Miscela cristallina contenente: 1 parte di acido solfanilico, 1 parte di N-(L-naftil)-etilen-diamina dicloridrato, 10 parti di acido L-(+)-tartarico (è stabile per un anno se conservata a temperatura ambiente, al buio).

**Procedimento:**

- Sospendere un'ansata di colonie micobatteriche in 0,5 ml di acqua distillata sterile.
- Aggiungere 2 ml di brodo per nitrati e incubare per 4 ore a 37°C.
- Al termine dell'incubazione aggiungere una piccola spatolata della miscela cristallina ed agitare.

Il test è positivo se si sviluppa, entro pochi secondi, una colorazione da rosa a rosso mentre è negativo se non si rileva alcun cambiamento di colore.

**Controllo di qualità:**

Controllo positivo: *Mycobacterium tuberculosis*; controllo negativo: *Mycobacterium gordonae*.

### 5.1.8 Riduzione del tellurito

**Principio:**

Molti micobatteri sono capaci di ridurre il tellurito di potassio a tellurio metallico.

**Reagenti:**

- Soluzione acquosa allo 0,2% di tellurito di potassio, sterilizzata per filtrazione e distribuita in piccole aliquote (0,5 ml).
- Brodo Middlebrook 7H9 (contenente l'arricchimento OADC e preparato utilizzando Tween 80 in luogo della glicerina) distribuito in provette (5 ml).

**Procedimento:**

- Inoculare pesantemente una provetta di Middlebrook 7H9 con il ceppo micobatterico in esame.

- Incubare a 37°C per 7 giorni, in modo da ottenere una sospensione torbida e, al termine dell'incubazione, aggiungere alla provetta 2 gocce di tellurito di potassio.
- Incubare nuovamente la provetta a 37°C.
- Dopo 3 giorni verificare se nel sedimento è presente o meno un precipitato nero (tellurio metallico) indice di positività.

**Controllo di qualità:**

Controllo positivo *Mycobacterium avium*, controllo negativo *Mycobacterium gordonae*.

### 5.1.9 Idrolisi del Tween 80

**Principio:**

Alcune specie di micobatteri dotate di attività esterasica sono in grado di idrolizzare il Tween 80. Utilizzando come reagente Tween 80 legato al colorante rosso neutro si ha un viraggio al rosso per effetto dell'idrolisi.

**Reagenti:**

TB hydrolysis reagent (Becton Dickinson).

**Procedimento:**

- Aggiungere ad una provetta contenente 1 ml di acqua distillata sterile 2 gocce di reagente e stemperarvi un'ansata di colonie micobatteriche.
- Incubare a 37°C, al buio.
- Eseguire una prima lettura dopo 5 giorni e quella definitiva dopo 10 giorni.

L'avvenuta idrolisi si riconosce dal viraggio al rosso del liquido inizialmente color ambra.

**Controllo di qualità:**

Controllo positivo: *Mycobacterium kansasii*; controllo negativo: *Mycobacterium xenopi*.

### 5.1.10 Ureasi

**Principio:**

Alcune specie di micobatteri sono capaci di idrolizzare l'urea.

**Reagenti:**

- Urea broth (Becton Dickinson).

**Procedimento:**

- Stemperare un'ansata di colonie in 0,5 ml di acqua distillata sterile e aggiungervi un dischetto di urea.
- Incubare per tre giorni a 37°C.

La positività della reazione è evidenziata dal viraggio al rosso porpora dell'indicatore presente nel liquido.

**Controllo di qualità:**

Positivo *Mycobacterium bovis*, negativo *Mycobacterium gordonae*.

**BIBLIOGRAFIA**

- Kent P.T., Kubica G.P. Identification test techniques. 1985. In: Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. 71-120. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Diseases Control, Atlanta.
- Lutz B. Identification tests for mycobacteria. 1992. In: H.D. Isenberg (ed.): Clinical microbiology procedures handbook. 3.12.1-3.12.29. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Wayne L.G., Kubica G.P. Genus *Mycobacterium* Lehmann and Neumann 1896, 363al. 1986. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (ed.): Bergey's manual of systematic bacteriology. 1435-1457. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

## 5.2 IDENTIFICAZIONE CON NAP-TEST

### **Principio:**

Il NAP-test è una prova di inibizione selettiva utilizzata con i terreni liquidi del metodo radiometrico. Il NAP (p-nitro- $\alpha$ -acetilammino- $\beta$ -idrossipropiofenone) è capace di inibire lo sviluppo delle specie appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex mentre è tollerato dai micobatteri non tubercolari. Anche la specie *Mycobacterium genavense*, descritta di recente, risulta totalmente inibita dal NAP.

### **Reagenti:**

- Una coltura pura del micobatterio in esame in brodo radiometrico Bactec 12A (Becton Dickinson) con un growth index (GI) compreso fra 50 e 100.
- Un flaconcino contenente un dischetto impregnato di NAP (Bactec NAP, Becton Dickinson).

### **Procedimento:**

- Trasferire 1 ml della coltura suddetta, dopo averla ben omogeneizzata con una siringa, nel flaconcino contenente il dischetto impregnato con NAP. Qualora la coltura abbia un GI > 100 è necessario diluirla secondo lo schema in tabella 7 prima di effettuare il trasferimento.
- Incubare a 37°C e leggere giornalmente, con l'apparecchio Bactec 460TB, sia la brodocoltura usata per l'inoculo (che servirà da controllo) sia quella contenente NAP, per un massimo di sette giorni.

Il GI dei ceppi di MOTT tende a salire in entrambi i flaconi (controllo e NAP) mentre la crescita di quello dei ceppi appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex si verifica esclusivamente nel flacone di controllo.

**Tabella 7. Schema di diluizione**

Growth index	Volume (ml) da trasferire in un nuovo flacone 12B
101-200	0,8
201-400	0,6
401-600	0,4
601-800	0,3
801-999	0,2
999 da più di un giorno	0,1

### **Controllo di qualità:**

Controllo positivo (non inibito): *Mycobacterium kansasii*; controllo negativo (inibito) *Mycobacterium tuberculosis*.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Siddiqi S.H. Identification. 1989. In: Bactec TB system Product and procedure manual. Revision B. Becton Dickinson Diagnostic Instruments System Towson.

## 5.3 IDENTIFICAZIONE CON HPLC

### **Principio:**

Nella parete dei micobatteri sono presenti vari acidi grassi a catena lunga denominati acidi micolici. Gli acidi micolici, una volta estratti e derivatizzati, possono essere separati mediante *high performance liquid chromatography* (HPLC) dando luogo a traccianti specie-specifici che permettono, per confronto con traccianti di riferimento, l'identificazione diretta del microrganismo.

### **Reagenti:**

- Potassa alcolica: idrato di potassio al 25% in etanolo al 50%.
- Cloroformio.
- Acido cloridrico al 18,5%.
- Bicarbonato di potassio al 1%.
- Diciclohexyl-18-crown-6 etere.
- p-Bromofenacil bromuro.
- Soluzione chiarificante: acido cloridrico al 18,5% e metanolo, in parti uguali.
- Metanolo.
- Standard interni ad alto e basso peso molecolare (Ribi ImmunoChem)

Preparazione della miscela di derivatizzazione: sciogliere 74 mg di diciclohexyl-18-crown-6 etere e 550 mg di p-bromofenacil bromuro in 10 ml di cloroformio.

### **Procedimento:**

- Trasferire un'ansata di colonie in una provetta con tappo a vite provvisto di guarnizione in teflon, contenente 2 ml di potassa alcolica, vortexare per 30 secondi ed autoclavare per 1 ora a 121°C.
- Dopo che la provetta si è raffreddata aggiungere 2 ml di cloroformio e 1,5 ml di acido cloridrico e vortexare per 30 s.
- Trasferire lo strato sottostante (cloroformio) in una nuova provetta e portare a secco sotto flusso di aria.
- Aggiungere 0,1 ml di bicarbonato di potassio al 1% e portare a secco.
- Raffreddare ed aggiungere 1 ml di cloroformio.
- Aggiungere 0,1 ml di miscela di derivatizzazione, vortexare per 30 s, tappare bene e incubare per 20 minuti in bagnomaria a 95°C.
- Trasferire lo strato di cloroformio in una nuova provetta e portare a secco.
- Raffreddare, aggiungere 1 ml di soluzione chiarificante e vortexare per 30 s.
- Trasferire lo strato di cloroformio in una nuova provetta e portare a secco.
- Conservare in frigo fino al momento dell'uso.
- Prima dell'iniezione riprendere il sedimento con 100 µl di cloroformio, aggiungere 5 µl di standard interno e filtrare.

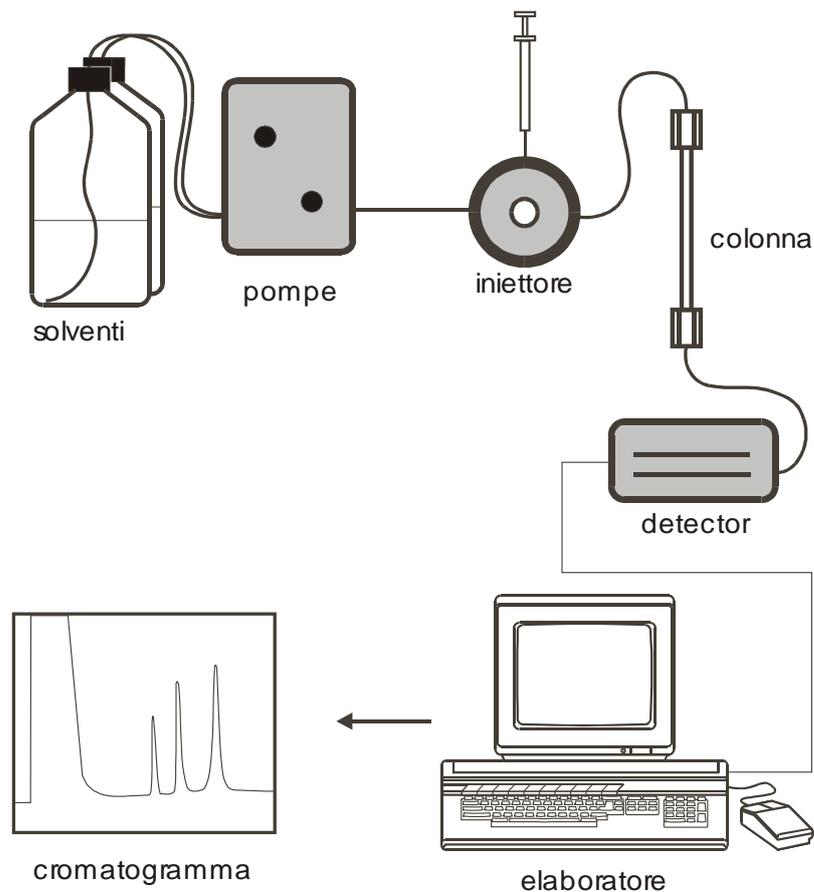


Figura 3. HPLC, strumentazione

- Iniettare 5  $\mu$ l nell'apparecchio cromatografico equipaggiato con una colonna a fase inversa C-18 ultrasphere-XL (figura 3).

**Condizioni cromatografiche:**

- Condizione iniziale: metanolo 98%; cloruro di metilene 2%.
- Passaggio in 1 minuto a: metanolo 80%; cloruro di metilene 20%.
- Passaggio in 9 minuti a: metanolo 35%; cloruro di metilene 65%.
- Ritorno in 30 secondi alla condizione iniziale che viene mantenuta per 1,5 min.
- Flow rate: 2.5 ml/min.

L'identificazione si raggiunge trovando tra i profili di riferimento un tracciato identico a quello del micobatterio in esame (figura 4). Per un più accurato confronto dei tracciati cromatografici occorre calcolare per ciascun picco il tempo di ritenzione relativo (rapporto fra il tempo di ritenzione di ciascun singolo picco e quello del picco corrispondente allo standard interno ad alto peso molecolare).

**Controllo di qualità:**

In ogni serie includere come controllo un ceppo di *Mycobacterium intracellulare*.

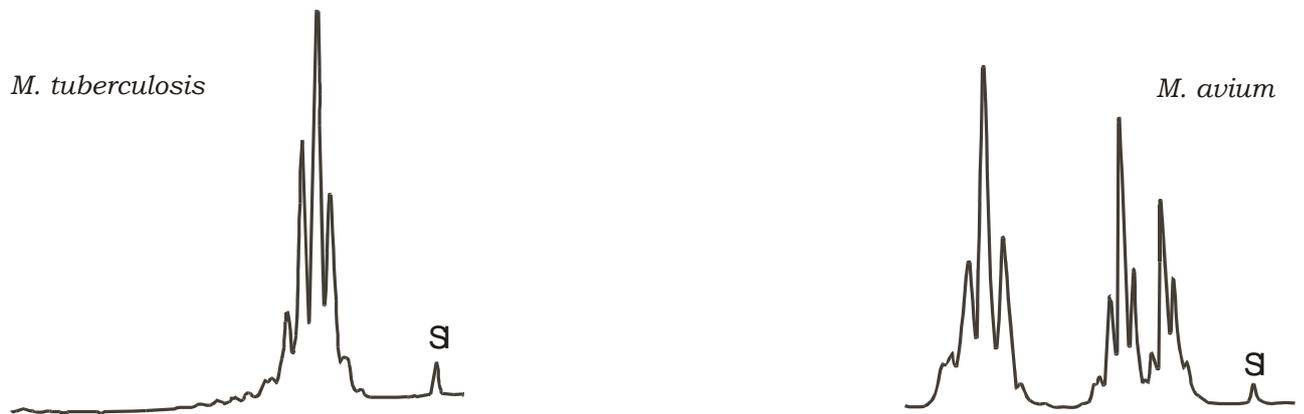


Figura 4. Esempi di profili di acidi micolici in HPLC

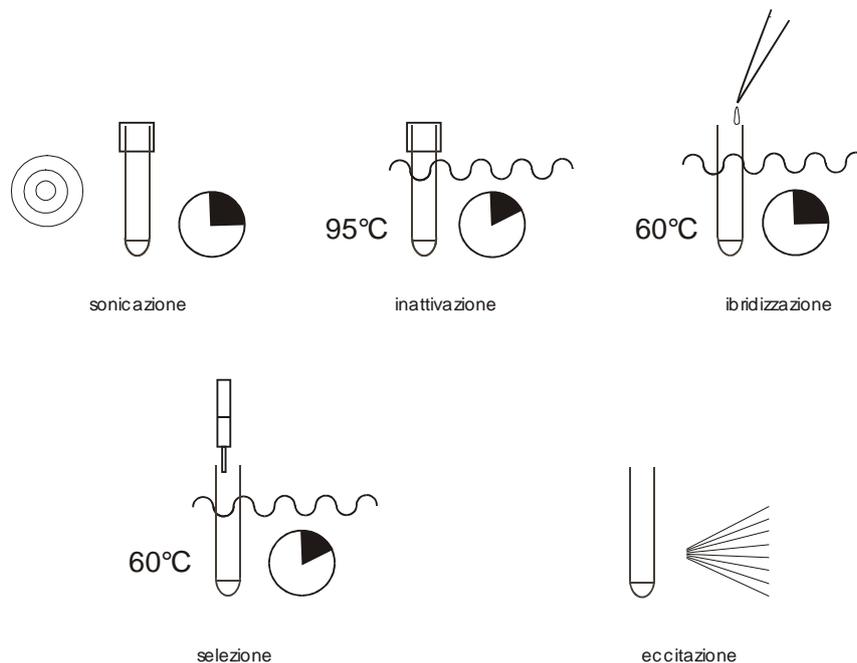
## BIBLIOGRAFIA

- Butler W.R., Thibert L., Kilburn J.O.. Identification of *Mycobacterium avium* complex strains and some similar species by high-performance liquid chromatography. 1992. J. Clin. Microbiol. 30:2698-2704.
- Tortoli E., Bartoloni A. High-performance liquid chromatography and identification of mycobacteria. 1996. Rev. Med. Microbiol. 7:207-219.

## 5.4 IDENTIFICAZIONE CON DNA-PROBE

### Principio:

Si impiegano sonde marcate costituite da DNA a catena singola complementare di una sequenza nucleotidica del genoma batterico che è specie-specifica (rRNA 16S); qualora la sonda riconosca, nel materiale genetico del microorganismo in esame, la sequenza complementare dà luogo ad ibridizzazione. La marcatura è realizzata con molecole chemiluminescenti che, una volta eccitate, emettono radiazioni luminose rilevabili con un luminometro, consentendo così il riconoscimento della molecola ibrida neofornata e quindi l'identificazione del microorganismo (figura 5).



**Figura 5. Identificazione mediante DNA-probe**

### Reagenti:

- Kit Accuprobe (Gen-Probe).

### Procedimento:

- Sospendere, con un'ansa da 1 µl, una piccola quantità di coltura micobatterica nella provetta contenente 100 µl di tampone, 100µ di soluzione lisante e alcune palline di vetro; agitare al vortex.
- Lisare le cellule mediante trattamento con ultrasuoni per 15 minuti.
- Incubare per 10 minuti a 95°C.
- Trasferire 100 µl di lisato nella provetta contenente il probe liofilo e incubazione per 15 minuti a 60°C.
- Aggiungere il reattivo di “selezione” ed incubazione per 5 minuti a 60°C.

- Dopo 5 minuti a temperatura ambiente, effettuare la lettura utilizzando l'apposito luminometro.

A seconda della quantità di luce rilevata l'apparecchio fornisce direttamente il risultato positivo o negativo. In caso di positività l'identificazione corrisponde alla specificità del probe impiegato.

L'identificazione mediante DNA-probe prevede il cimento, in successione, del ceppo in esame con i vari probe disponibili, fino al conseguimento di una reazione positiva; generalmente l'osservazione delle caratteristiche delle colonie permette di limitare il saggio soltanto al probe o ai probe corrispondenti alle specie più probabili.

E' possibile impiegare i DNA probe anche per l'identificazione delle colture in terreno liquido centrifugandone 1,5 ml per 20 minuti a 4000 x g ed eseguendo il test di ibridizzazione dopo aver trasferito 100 µl di sedimento nella provetta contenente 100 µl di soluzione lisante e le palline di vetro.

Qualche interferenza dovuta al sangue si può avere con le emocolture, al problema è però possibile ovviare mettendo in contatto, in una provetta, 1 ml di emocoltura e 100 µl di una soluzione 0,05M di EDTA contenente 10% di sodio dodecil-solfato a pH 7,2; il test viene eseguito, con le modalità usate per le colture in terreno liquido, su 100 µl di sedimento ottenuto per centrifugazione dopo un lavaggio con acqua distillata.

**Controllo di qualità:**

In ogni seduta sottoporre al test due ceppi uno dei quali appartenente alla specie per cui il probe è specifico.

**BIBLIOGRAFIA**

- o Stockman L. DNA probes for identification of mycobacteria. 1992. In: H.D. Isenberg (ed.): Clinical microbiology procedures handbook. 3.15.1-3.15.4. American Society for Microbiology, Washington.

## 6 TEST DI SENSIBILITÀ

Claudio Scarparo, Claudio Piersimoni

I micobatteri appartenenti al *M. tuberculosis* complex e quelli delle varie specie non tubercolari differiscono tra loro per il ruolo che assumono nelle infezioni umane, per le caratteristiche biologiche, per la necessità di diversi fattori di crescita e per la sensibilità ai farmaci. Non esistono farmaci antimicobatterici genericamente validi in tutte le circostanze. Dovrebbe essere quindi saggiata una batteria di farmaci specifica per ogni specie micobatterica, scelta sulla base delle conoscenze relative all'efficacia di tali farmaci *in vivo* e/o alla loro attività *in vitro*; inoltre la composizione dei terreni e le condizioni di crescita dovrebbero soddisfare le esigenze di crescita della specie micobatterica in esame essendo allo stesso tempo ottimali per l'attività del farmaco.

I metodi qualitativi, che utilizzano un'unica concentrazione di farmaco, definita concentrazione critica, consentono soltanto di determinare se il micobatterio in esame è sensibile o resistente. Questo approccio si è dimostrato valido per il *Mycobacterium tuberculosis*, che presenta, nei ceppi selvaggi, una notevole uniformità nel grado di sensibilità alla maggior parte dei farmaci e una chiara distinzione dagli isolati che presentano resistenza.

I metodi quantitativi consentono di misurare il grado di sensibilità degli isolati clinici determinando la minima concentrazione inibente (MIC), che corrisponde alla più bassa concentrazione del farmaco capace di inibire in vitro più del 99% della popolazione micobatterica in esame. La determinazione della MIC può essere importante per quelle specie caratterizzate da un ristretto intervallo tra sensibilità e resistenza ad un determinato farmaco.

Le MIC devono essere determinate in un terreno liquido privo di componenti in grado di inattivare in modo significativo il farmaco o di alterare (come ad es. il Tween 80) la naturale permeabilità ai farmaci della parete del micobatterio.

### 6.1 TEST DI SENSIBILITÀ PER *M. TUBERCULOSIS* COMPLEX

La sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis* complex ai farmaci antitubercolari può essere saggiata usando tre diverse metodiche: quella delle proporzioni, quella delle concentrazioni assolute e quella del rapporto di resistenza (*resistance-ratio*). Tutti e tre i metodi, quando applicati in modo corretto e standardizzato, forniscono risultati clinicamente utili.

Il metodo delle proporzioni, quello più largamente impiegato, è considerato il sistema di riferimento. Il rationale di tale metodo si basa sull'osservazione empirica secondo la quale, se in una popolazione micobatterica è presente più del 1% di mutanti resistenti ad un farmaco, tale popolazione è da considerarsi resistente, in quanto la percentuale suddetta è destinata ad aumentare rapidamente per effetto della pressione selettiva esercitata da una terapia che utilizzi il farmaco in questione.

Il test di sensibilità col metodo delle proporzioni è stato messo a punto sia per terreni solidi, a base di uovo o agarizzati, che per il terreno liquido radiometrico.

#### 6.1.1 I farmaci antitubercolari

I farmaci in polvere da utilizzare per il saggio della sensibilità possono essere richiesti alle industrie farmaceutiche produttrici o essere acquistati dal commercio; è sconsigliato l'uso di preparazioni parenterali standard.

Una volta aperti i flaconi, le polveri devono essere conservate in essiccatore a  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  o come raccomandato dal produttore. Di ciascun farmaco devono essere note la potenza e la data di scadenza.

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

La potenza corrisponde alla quantità, in µg, di farmaco attivo presente in un mg di polvere; essa non è quasi mai pari al 100% e varia da lotto a lotto.

Per determinare la quantità di polvere (o di diluente) necessari per la preparazione di una soluzione standard, possono essere utilizzate le seguenti formule:

$$\text{Peso (mg)} = \text{Volume del solente (ml)} \times \text{Concentrazione desiderata (µg/ml)} / \text{Potenza (µg/ml)}$$

$$\text{Volume (ml)} = \text{Peso (mg)} \times \text{Potenza (µg/ml)} / \text{Concentrazione desiderata (µg/ml)}$$

La soluzione madre deve essere preparata, quando possibile, con acqua distillata sterile, ad una concentrazione di almeno 1000 µg/ml o comunque ad una concentrazione almeno dieci volte superiore rispetto alla più alta da testare. Per alcuni farmaci che presentano una scarsa solubilità può rendersi necessario il ricorso a concentrazioni più basse.

Le soluzioni madre devono essere sterilizzate mediante filtrazione (pori da 0,22 µm) scartando la prima parte (10-15%) della soluzione passata attraverso il filtro.

Alcuni farmaci non solubili direttamente in acqua richiedono solventi diversi, quali metanolo, etanolo o dimetil-solfossido; in questi casi si deve utilizzare la minima quantità di solvente necessaria a sciogliere la polvere usando poi acqua distillata o un idoneo tampone per raggiungere la concentrazione da testare. Le soluzioni con tali solventi sono autosterilizzanti.

Le soluzioni madre possono essere conservate a -70°C, in piccole aliquote, per almeno sei mesi, senza significativa perdita di attività. Tali soluzioni, una volta scongelate, devono essere utilizzate in giornata; la porzione di farmaco non usata non può essere ricongelata e deve essere eliminata. Per ciascun farmaco devono essere inoltre seguite le indicazioni fornite dal produttore.

La concentrazione critica è, per ciascun farmaco, quella che inibisce la crescita della maggior parte dei microorganismi di un ceppo selvaggio di bacillo tubercolare senza apprezzabili effetti sullo sviluppo dei mutanti resistenti.

**Tabella 8. Concentrazioni dei farmaci raccomandati per i test di sensibilità per *M. tuberculosis***

Farmaco	Solvente	Concentrazione in µg/ml nei vari terreni			
		Bactec 12B	L.J.	7H10	7H11
Streptomicina	Acqua distillata	2,0 <sup>a</sup>	4	2	2
		6	-	10	10
Isoniazide	Acqua distillata	0,1 <sup>a</sup>	0,2	0,2	0,2
		0,4	1	1	1
Rifampicina	Metanolo	2,0	40	1	1
Etambutolo	Acqua distillata	2,5 <sup>a</sup>	2	5	7,5
		7,5	6	10	-
Pirazinamide	Acqua distillata	100 <sup>b</sup>	-	25-50 <sup>c</sup>	50 <sup>c</sup>
Ac. p-aminosalicilico	Acqua distillata	4	0,5	2	8
Etionamide	Dimetil-solfossido	5	20	5	10
Kanamicina	Acqua distillata	5	20	5	6
Capreomicina	Acqua distillata	5	20	10	10
D-Cicloserina	Acqua distillata	50	30	30	30
Ciprofloxacina	Acqua distillata	1	-	1	1
Ofloxacina	Acqua distillata	2	-	2	2

<sup>a</sup> Concentrazione critica;

<sup>b</sup> pH = 6;

<sup>c</sup> pH = 5,5

Nella tabella 8 sono riportate le concentrazioni da testare nei vari terreni.

La pirazinamide è attiva contro il *Mycobacterium tuberculosis* solo a valori di pH di 5,5 o più bassi. La scarsa adattabilità della maggior parte dei micobatteri tubercolari alla crescita in presenza di tali valori di pH rende problematica l'esecuzione dei test di sensibilità per questo farmaco, in particolar modo sui terreni solidi.

Il PAS, l'etionamide, la kanamicina, la capreomicina e la cicloserina, sono farmaci di seconda scelta e dovrebbero essere testati solo in laboratori di riferimento, in presenza di accertate resistenze ai farmaci di prima scelta.

### 6.1.2 Saggio su terreni solidi

#### **Principio:**

Nel metodo delle proporzioni, una sospensione standardizzata del micobatterio in esame viene inoculata su una serie di terreni solidi contenenti i singoli farmaci e su un terreno di controllo senza alcun farmaco. La stessa sospensione, diluita 100 volte, viene inoculata su una seconda serie di terreni completa di controllo senza farmaco. Dopo il necessario periodo di incubazione viene utilizzata per la lettura la diluizione che presenta sul terreno di controllo un numero contabile (50 – 500) di colonie. Calcolando la proporzione, rispetto al controllo, delle colonie cresciute su ciascun terreno con farmaco possono essere determinate, in base al criterio del 1%, la sensibilità o la resistenza.

Possono essere utilizzati per i test di sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis* sia terreni a base di uovo, quali il Lowenstein-Jensen, sia i terreni agarizzati Middlebrook, 7H10 e 7H11. I terreni all'uovo sono i meno indicati per il test di sensibilità, perché i farmaci vengono parzialmente inattivati, sia durante la solidificazione del medium, sia dal legame con i fosfolipidi, le proteine e con certi aminoacidi presenti nel terreno.

L'uso del terreno di Middlebrook 7H10 supplementato con OADC è raccomandato, come terreno standard per il test di sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis* secondo il metodo delle proporzioni, dai Centers for Disease Control (CDC) e dal National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Poiché la crescita di alcuni isolati di *Mycobacterium tuberculosis*, in particolare i ceppi farmaco-resistenti, può risultare stentata su questo terreno, si può ricorrere in alternativa all'utilizzo del terreno di Middlebrook 7H11.

Il test di sensibilità può essere eseguito usando una procedura diretta o indiretta.

Il test diretto, eseguibile esclusivamente sui campioni positivi all'esame microscopico, utilizza per l'inoculo direttamente il campione biologico, previa decontaminazione e concentrazione.

Nel test indiretto l'inoculo viene allestito da una coltura pura del micobatterio in esame ottenuta sui terreni di isolamento primario.

#### 6.1.2.1 Saggio su terreni a base di uovo

#### **Reagenti:**

- Due serie di tubi di Lowenstein-Jensen con farmaci incorporati, da conservare a 4°C.
- Due tubi di Lowenstein-Jensen senza farmaci.
- Brodo Middlebrook 7H9.
- Piastre di agar sangue e di Middlebrook 7H10.

I terreni con i farmaci incorporati esistono in commercio prodotti da varie ditte ma, per la rapida diminuzione dell'attività dei farmaci, se ne consiglia la preparazione in laboratorio.

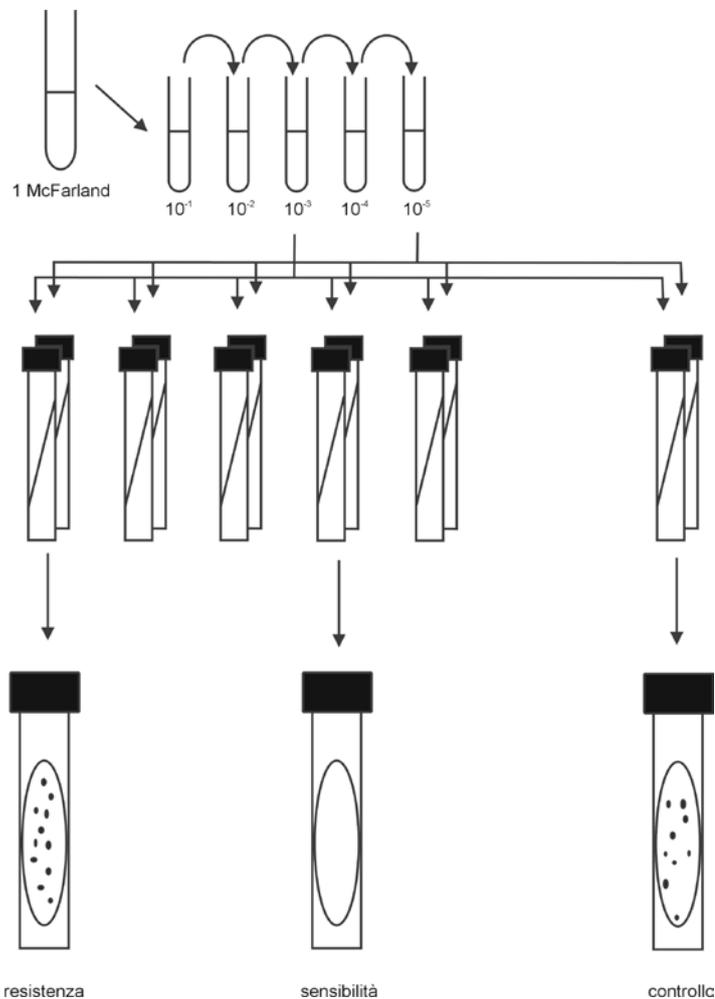
I farmaci, le cui concentrazioni sono riportate nella tabella 8, devono essere aggiunti al terreno prima delle uova, agitando per ottenere una uniforme distribuzione.

Dopo l'aggiunta delle uova e del verde malachite, distribuire il terreno in provettoni sterili e fare solidificare, in posizione inclinata, per 45 minuti in coagulatore a 85°C.

Conservare i tubi a 4°C.

**Procedimento** (figura 6):

- Prelevare 5-10 colonie (rappresentative di eventuali diversi morfotipi) e trasferirle in una provetta sterile con tappo a vite contenente 4 ml di brodo Middlebrook 7H9 e 6-10 palline di vetro.
- Vortexare per vari minuti e lasciare sedimentare le particelle più grossolane per circa 30 minuti.
- Aspirare il soprannatante e trasferirlo in una seconda provetta aggiustando poi la torbidità della sospensione con brodo 7H9 fino allo standard n. 1 di McFarland.



**Figura 6: Antibiogramma per *M. tuberculosis* su Lowenstein-Jensen**

- Preparare delle diluizioni  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  di tale sospensione con acqua distillata sterile (0,5 ml di sospensione madre in 4,5 ml di acqua distillata).

- Inoculare la prima serie di terreni con 0,2 ml della diluizione  $10^{-3}$ .
- Inoculare la seconda serie di terreni con 0,2 ml della diluizione  $10^{-5}$ .
- Inoculare una piastra di agar sangue ed una di Middlebrook 7H11 con una goccia della sospensione non diluita.
- Incubare i tubi a  $37^{\circ}\text{C}$ , per alcuni giorni in posizione inclinata e con il tappo allentato, e quindi, quando saranno ben asciutti, in posizione verticale avvitando bene il tappo.
  
- Verificare per qualche giorno la sterilità della piastra di agar sangue per confermare la purezza dell'inoculo e esaminare quella di 7H10, per tutta la durata del test, per verificare la presenza di un unico ceppo micobatterico.
- Ripetere il test in presenza di contaminazione.
- Una prima lettura si esegue dopo 28 giorni e la seconda dopo 42 giorni. La prima lettura è definitiva solo per i farmaci verso i quali il ceppo risulta resistente.
- Calcolare la percentuale di resistenza facendo il rapporto fra il numero di colonie cresciute sul terreno col farmaco e il numero di colonie cresciute sul terreno di controllo.
- Interpretare il risultato come resistente quando tale percentuale è  $\geq 1\%$  e come sensibile quando è  $< 1\%$ .
- Refertare le concentrazioni dei farmaci e l'interpretazione.

Per l'interpretazione dei risultati deve essere utilizzata la serie di terreni che presenta, sul tubo del controllo, un numero contabile di colonie (idealmente 50-100).

Non devono essere utilizzati per l'interpretazione terreni che presentino sul controllo meno di 50 colonie (possibilità di ottenere false sensibilità) o più di 500 colonie (possibilità di ottenere false resistenze); in tali casi il test deve essere ripetuto.

E' possibile interpretare il test anche quando sul controllo è presente una crescita confluyente solo se il ceppo mostra sensibilità a tutti i farmaci.

Una versione semplificata del metodo prevede l'inoculo, utilizzando la sospensione diluita  $10^{-3}$ , di una sola serie di terreni contenenti i farmaci e di due coppie di controlli con le diluizioni  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ . La lettura si effettua al 28° giorno. Se il numero di colonie presenti sul controllo inoculato con diluizione  $10^{-3}$  è troppo abbondante il loro numero viene estrapolato moltiplicando per 100 il numero delle colonie sviluppatesi sul controllo inoculato con la diluizione  $10^{-5}$ . I risultati ottenuti con questa tecnica semplificata sono comparabili con quelli ottenuti col metodo precedente.

### **Controllo di qualità:**

La performance dei farmaci può essere controllata effettuando il test di sensibilità con dei ceppi micobatterici di controllo. Esistono ceppi ATCC di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti a ciascuno dei farmaci maggiori. Tuttavia tali ceppi, essendo resistenti ad alte concentrazioni di farmaco, non risultano particolarmente adatti al controllo di qualità e possono essere utilmente sostituiti da isolati clinici resistenti ai singoli farmaci.

Il ceppo H37Rv (ATCC 27294), sensibile a tutti i farmaci, deve essere testato per ogni nuovo lotto di terreno e almeno una volta alla settimana; il test deve essere ripetuto in presenza di resistenza ad uno qualsiasi dei farmaci o qualora il terreno di controllo non registri alcuna crescita entro tre settimane.

La sospensione del ceppo di controllo in brodo 7H9 può essere mantenuta congelata a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Per valutare la sterilità del terreno incubare il 10% di ciascun nuovo lotto (tali terreni possono poi essere riusati per il test) a 37°C per 48 ore ed eliminare l'intero lotto in presenza di più terreni contaminati.

### 6.1.2.2 Saggio su terreni agarizzati

#### **Reagenti:**

- Piastre di Petri divise in quadranti.
- Farmaci in polvere o, in alternativa, dischi impregnati con i farmaci (Sensi-Disc, Becton Dickinson).
- Terreno 7H10 con OADC mantenuto liquido in bagnomaria a 45-50°C.
- Piastre di agar sangue e di Middlebrook 7H10.

#### **Procedimento:**

##### a) Preparazione del terreno

- Distribuire 5 ml dell'agar senza farmaco in un quadrante di ciascuna piastra di Petri.
- Aggiungere, ad un opportuno volume di terreno fuso contenente l'arricchimento, la quantità di farmaco occorrente per ottenere la concentrazione finale desiderata (tabella 8).
- Distribuire nei quadranti rimanenti 5 ml di agar contenente i singoli farmaci.
- Lasciare solidificare l'agar a temperatura ambiente e poi stoccare, per non oltre un mese, in buste di plastica al buio a 4°C.

Qualora vengano utilizzati i dischetti impregnati questi, una volta deposti nei quadranti (tabella 9), devono essere ricoperti di terreno fuso.

Dopo la solidificazione del terreno le piastre vengono incubate per una notte a 37°C per facilitare la diffusione dei farmaci nel terreno.

**Tabella 9. Metodo dell'agar eluizione, concentrazioni degli antibiotici**

Piastra	Quadrante	Farmaco	Concentrazione del farmaco (µg/ml)	
			nel dischetto	nel terreno
1	I	controllo 1	-	-
	II	Isoniazide	1	0,2
	III	Isoniazide	5	1
	IV	Etambutolo	25	5
2	I	controllo 2	-	-
	II	Streptomicina	10	2
	III	Streptomicina	50	10
	IV	Rifampicina	5	1

##### b) Inoculo e incubazione (figura 7)

- Prelevare 5-10 colonie (rappresentative di eventuali diversi morfotipi) e trasferirle in una provetta sterile con tappo a vite contenente 4 ml di brodo Middlebrook 7H9 e 6-10 palline di vetro.

### AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Vortexare per vari minuti e lasciare sedimentare le particelle più grossolane per circa 30 minuti.
- Aspirare il supernatante e trasferirlo in una seconda provetta aggiustando poi la torbidità della sospensione con brodo 7H9 fino allo standard n. 1 di McFarland.
- Preparare delle diluizioni  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  con acqua distillata sterile dalla sospensione suddetta (0,5 ml di sospensione madre in 4,5 ml di acqua distillata).
- Accertarsi che la superficie del terreno da inoculare sia asciutta, asportando eventuali gocce di condensa con un tampone sterile.

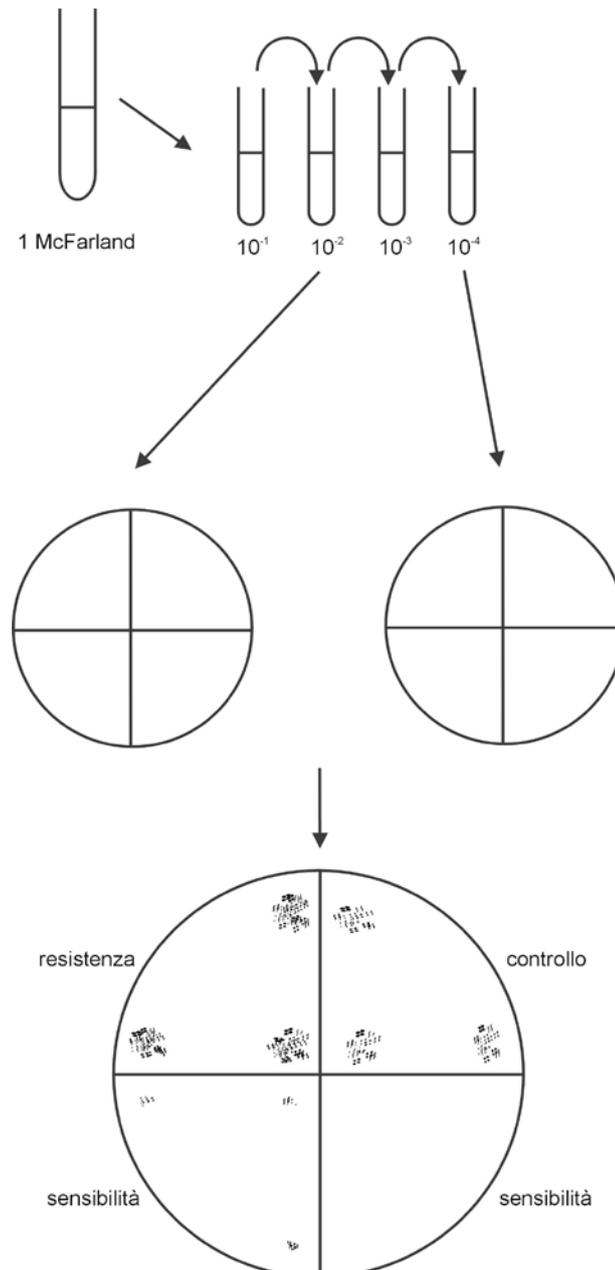


Figura 7: Antibiogramma per *M. tuberculosis* su piastra di terreno di Middlebrook

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Inoculare i vari quadranti di una prima serie di piastre con la sospensione  $10^{-2}$ , usando una pipetta Pasteur e ponendo, senza mai toccare l'agar, una goccia ai tre angoli di ciascun quadrante. Tenere la pipetta perpendicolare al terreno per far sì che le gocce siano uniformi e fare attenzione che queste non scorrano sul bordo della piastra dove la conta delle colonie risulterebbe difficoltosa.
- Inoculare una seconda serie di terreni con la diluizione  $10^{-4}$ .
- Inoculare una piastra di agar sangue ed una di Middlebrook 7H10 con 1-2 gocce della sospensione non diluita.
- Lasciare asciugare le piastre inoculate, non capovolte, a temperatura ambiente, sotto cappa di sicurezza biologica, per circa 1 ora.
- Chiudere ciascuna piastra in una busta di polietilene permeabile alla  $CO_2$  e porre a  $36^\circ C$  in atmosfera al 5-10% di  $CO_2$ .

### c) Lettura ed interpretazione

- Esaminare per qualche giorno la piastra di agar sangue per verificare la purezza dell'inoculo e, in presenza di contaminazione, ripetere il test.
- Esaminare il quadrante di controllo settimanalmente e leggere tutti i quadranti quando si evidenziano sul controllo almeno 50 colonie.
- Se la crescita non è sufficiente dopo 3 settimane di incubazione ripetere il test.
- Non dare mai una risposta di sensibilità prima di 3 settimane.
- Determinare la media del numero di colonie cresciute in ciascuno dei quadranti. Fare attenzione alla presenza di microcolonie, evidenziabili con lo stereomicroscopio.
- Interpretare i risultati ottenuti sulla serie di piastre che presenta sul quadrante di controllo un numero contabile di colonie (idealmente 50-100).
- Non usare per l'interpretazione una serie di piastre avente sul controllo un numero di colonie  $<50$  (che possono dar luogo a false sensibilità).
- E' possibile interpretare i risultati anche quando il controllo mostra una crescita confluyente se il micobatterio risulta sensibile a tutti i farmaci; in presenza di resistenze a qualche farmaco il test deve essere invece ripetuto (potrebbe trattarsi di false resistenze dovute all'inoculo troppo pesante).
- Calcolare la percentuale delle colonie cresciute sul terreno col farmaco rispetto a quelle cresciute sul terreno di controllo. Interpretare il risultato come resistente quando tale percentuale è  $\geq 1\%$ . La presenza di microcolonie suggerisce che l'isolato può essere resistente ma che il farmaco ha tuttavia una certa attività sul micobatterio e potrebbe risultare efficace in combinazione con altri farmaci.
- Refertare le concentrazioni dei farmaci e l'interpretazione.

### **Controllo di qualità:**

La performance dei farmaci può essere controllata utilizzando ceppi ATCC di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti a ciascuno dei farmaci maggiori o utilizzando isolati clinici resistenti ai singoli farmaci. Il ceppo H37Rv (ATCC 27294), sensibile a tutti i farmaci, deve essere testato per ogni nuovo lotto di terreno e almeno una volta alla settimana; il test deve essere ripetuto in presenza di resistenza ad uno qualsiasi dei farmaci o qualora il terreno di controllo non registri alcuna crescita.

### 6.1.3 Test diretto di sensibilità

**Principio:**

Il test di sensibilità può essere eseguito direttamente, previa decontaminazione, sui campioni positivi all'esame microscopico.

Possono essere impiegati sia terreni all'uovo che agarizzati

**Procedimento:**

- In base al numero di bacilli alcol-acido resistenti osservati per campo microscopico, preparare delle diluizioni del campione decontaminato e concentrato, con acqua distillata sterile, secondo lo schema riportato in tabella 10.
- Inoculare una serie completa di terreni (Lowenstein-Jensen o piastre di Middlebrook 7H10), contenenti antibiotici ed un controllo, con ciascuna delle diluizioni allestite dal campione.
- Incubare, leggere ed interpretare il test utilizzando la stessa procedura descritta per il corrispondente metodo indiretto.
- Se lo sviluppo è insufficiente sui terreni di controllo, ripetere il test con il metodo indiretto.

**Tabella 10. Diluizione del campione per il saggio della sensibilità del *M. tuberculosis* con il metodo diretto**

Numero di micobatteri per campo microscopico		Diluizioni finali
Colorazione con fucsina basica (1000x)	Colorazione con fluorocromi (400x)	
<1	<25	non diluita
1-10	25-250	10-1,10-2
>10	>250	10-2,10-3

### 6.1.4 Saggio su terreno radiometrico Bactec

#### 6.1.4.1 Sensibilità ai farmaci maggiori (esclusa la pirazinamide)

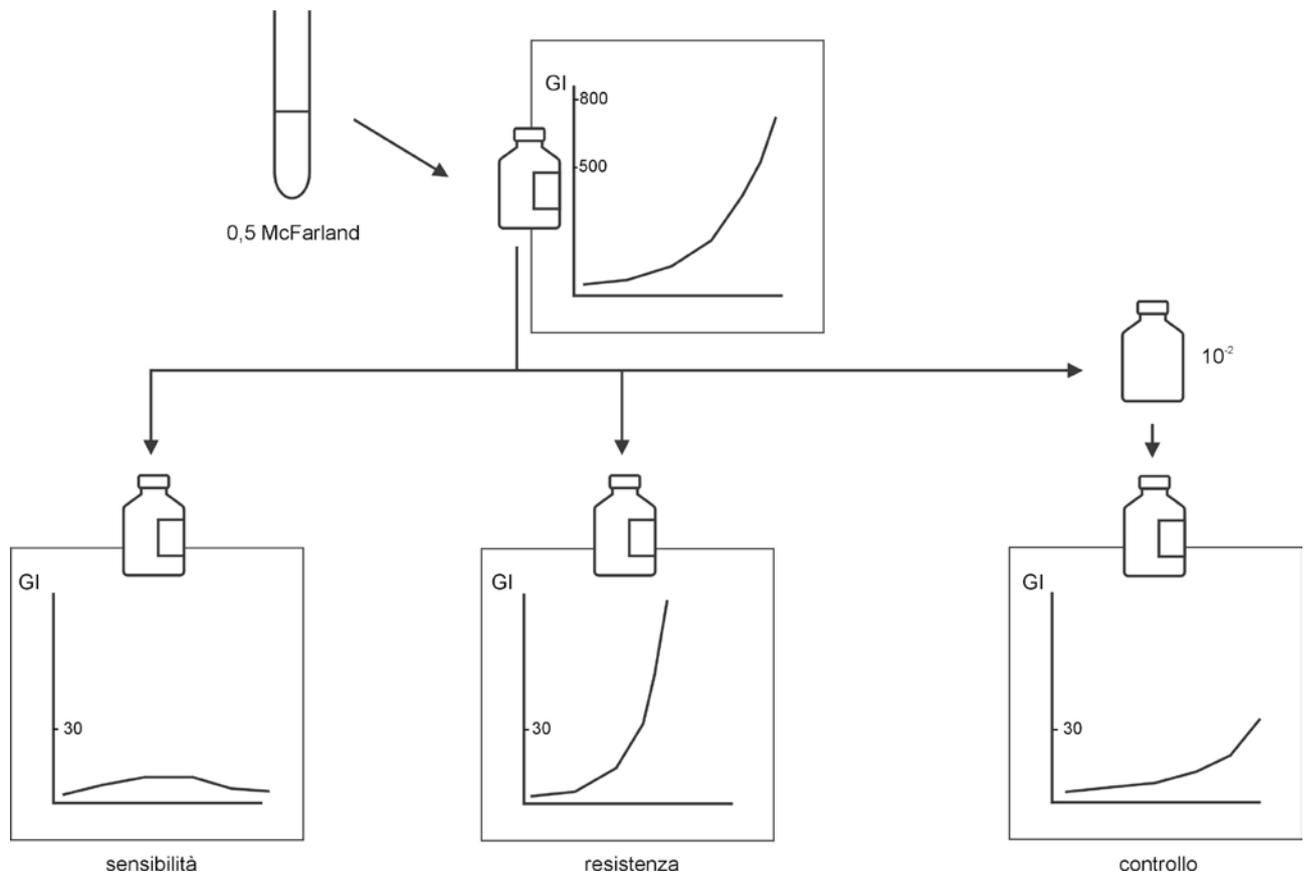
**Principio:**

La sensibilità ai farmaci antimicobatterici viene determinata, con il sistema radiometrico, seguendo una versione modificata del metodo delle proporzioni.

Con una sospensione micobatterica standardizzata si inocula una serie di flaconi Bactec 12B addizionati con le opportune concentrazioni dei singoli farmaci, mentre, con una diluizione 1/100 della stessa sospensione, si inocula un flacone di controllo senza farmaci (figura 8).

I flaconi vengono incubati e letti giornalmente con lo strumento Bactec 460TB. Una crescita più marcata in presenza di farmaco che non nel flaconcino di controllo (il cui inoculo è 100 volte più diluito) indica una percentuale di mutanti resistenti superiore al 1% ed il ceppo è da considerarsi resistente.

L'esecuzione, con il metodo radiometrico, del test diretto di sensibilità, utilizzando cioè direttamente il campione positivo all'esame microscopico, è sconsigliata essendo la letteratura al riguardo insufficiente.



**Figura 8: Antibiogramma per *M. tuberculosis* su terreno radiometrico Bactec**

**Reagenti:**

- Cinque flaconi Bactec 12B (Becton Dickinson).
- Fluido di diluizione (DF, Becton Dickinson).
- Farmaci liofilizzati (Bactec S.I.R.E., Becton Dickinson) comprendenti streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo.
- Una piastra di agar sangue ed una di Middlebrook 7H10.

**Procedimento:**

a) Preparazione dei terreni

- Ricostituire i farmaci aggiungendo 5 ml di acqua deionizzata sterile a ciascun flacone di liofilo. Agitare fino al completo dissolvimento.
- Per ciascun test da eseguire preparare una serie di terreni contenenti i singoli farmaci aggiungendo 0,1 ml di ciascuno di essi ad altrettanti flaconi Bactec 12B.
- Dividere in aliquote le soluzioni di farmaco non utilizzate e stocarle a 4°C (3 giorni), a - 20°C (3 mesi) o a - 70°C (6 mesi).

b) Preparazione dell'inoculo

Il saggio della sensibilità col sistema radiometrico prevede la lettura giornaliera fino al momento del raggiungimento, da parte del controllo, di un GI >30.

Qualora il laboratorio non sia operativo di domenica (o, a maggior ragione, durante il fine settimana) è preferibile allestire le prove di sensibilità solo al sabato (o al venerdì) e iniziare il lunedì la lettura dei flaconi inoculati.

Testare preventivamente i flaconi Bactec 12B con lo strumento Bactec 460TB per stabilirvi un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> (scartare eventuali flaconi con GI ≥20).

Qualora si parta da una coltura in terreno radiometrico il flacone deve essere incubato e letto giornalmente.

Se si raggiunge un valore di GI compreso fra 300 e 499 occorre incubare il flacone per altre 24 ore prima di effettuare l'inoculo.

Se si hanno valori di GI compresi fra 500 e 799 si può effettuare direttamente l'inoculo.

Se il GI è ≥ 800 occorre diluire 1 ml di tale coltura con 1 ml di fluido di diluizione prima di effettuare l'inoculo.

Quando è necessario rinviare l'esecuzione del test di sensibilità è possibile refrigerare a 4°C, per una settimana al massimo, il flacone della coltura positiva (GI >500).

Qualora si parta da colture in terreno liquido non radiomarcato occorre diluirle con fluido di diluizione fino ad ottenere una torbidità pari a quella dello standard 1 McFarland, o pari a quella dello standard 0,5 McFarland se si segue il programma che non prevede la lettura durante il fine settimana.

Qualora si parta da terreni solidi, prelevare alcune colonie rappresentative facendo attenzione a non asportare il terreno. Trasferire le colonie in un tubo di vetro con il tappo a vite contenente 6-10 palline di vetro e 3-4 ml di fluido di diluizione, vortexare per vari minuti e lasciare sedimentare le particelle più grossolane per circa 30 minuti. Aspirare il supernatante e trasferirlo in una seconda provetta aggiustando poi, con liquido di diluizione, la torbidità della sospensione sullo standard n. 1 di McFarland (o sullo standard 0,5 McFarland se si segue il programma che non prevede la lettura durante il fine settimana).

- Inoculare con 0,1 ml di sospensione micobatterica ognuno dei flaconi con il farmaco, usando una siringa da tubercolina con ago fisso. Con alcune gocce della sospensione di inoculo eseguire delle subcolture su piastre di agar sangue e Middlebrook 7H10.
- Preparare una diluizione 1/100 della sospensione di inoculo, aggiungendo 0,1 ml della stessa a 9,9 ml di fluido di diluizione, ed omogeneizzare bene aspirando e scaricando la siringa più volte.
- Inoculare il flacone di controllo con 0,1 ml della sospensione diluita 1/100.
- Disinfettare il tappo dei flaconi prima e dopo l'inoculo con apposito disinfettante e poi con alcool al 70%.
- Incubare a 37°C.

#### c) Lettura ed interpretazione

- Esaminare le piastre di agar sangue e di 7H10 per verificare la purezza dell'inoculo e la presenza di un solo ceppo micobatterico.
- Leggere i flaconi ogni giorno, circa alla stessa ora, per un minimo di 4 giorni ed un massimo di 14.
- Interpretare i risultati quando il GI del controllo risulta >30. Se il GI è ≥30 già dopo 1-2 giorni, l'inoculo è troppo pesante e occorre ripetere il test. Se il GI è ≥30 già al 3° giorno, occorre incubare per altre 24 ore prima di interpretare i risultati. Se il GI non raggiunge il valore di 30 entro 14 giorni di incubazione occorre ripetere il test.

- Per i laboratori non operativi di domenica (o durante il fine settimana) la lettura del lunedì non deve essere considerata dato che essa rappresenta la somma di due (o tre) giorni. Se un flacone di controllo inoculato al sabato (o al venerdì) presenta un GI  $\geq 30$  già il lunedì, l'inoculo è troppo pesante ed il test deve essere ripetuto; se il GI è  $\geq 30$  il martedì, leggere anche al mercoledì.
- Calcolare, per il controllo e per ciascun flacone col farmaco, la differenza ( $\Delta$ GI) fra il GI dell'ultima lettura e quella del giorno precedente. Se il  $\Delta$ GI del controllo è superiore al  $\Delta$ GI del flacone col farmaco il ceppo è da considerare sensibile a tale farmaco. Se il  $\Delta$ GI del controllo è inferiore al  $\Delta$ GI del flacone col farmaco il ceppo è da considerare resistente. Se il  $\Delta$ GI del controllo è uguale al  $\Delta$ GI del flacone col farmaco proseguire la lettura dei flaconi per altri 2-3 giorni, in tal modo è spesso possibile orientarsi verso la sensibilità o la resistenza; qualora però non emergano indicazioni chiare l'isolato deve essere considerato parzialmente resistente. Se il GI del flacone col farmaco supera 500 in una delle letture giornaliere e rimane  $>500$  il giorno successivo si deve considerare il ceppo come resistente al farmaco indipendentemente dal valore del  $\Delta$ GI.
- Refertare le concentrazioni dei farmaci e l'interpretazione.

**Controllo di qualità:**

La performance dei farmaci può essere controllata utilizzando ceppi ATCC di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti a ciascuno dei farmaci maggiori o utilizzando isolati clinici resistenti ai singoli farmaci. Il ceppo H37Rv (ATCC 27294), sensibile a tutti i farmaci, deve essere testato per ogni nuovo lotto di terreno e almeno una volta alla settimana; il test deve essere ripetuto in presenza di resistenza ad uno qualsiasi dei farmaci o qualora il terreno di controllo non registri alcuna crescita.

6.1.4.2 Sensibilità alla pirazinamide

**Principio:**

La pirazinamide è un farmaco attivo contro il *Mycobacterium tuberculosis* solo a bassi valori di pH (4,7-5,5). Tali livelli di pH inibiscono la crescita di molti ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* rendendo quindi problematica l'esecuzione del test di sensibilità a questo farmaco con i metodi convenzionali. Il terreno liquido impiegato a tale scopo nel sistema radiometrico presenta un pH di 6 che è a metà strada fra quello ottimale per l'attività del farmaco e quello ottimale per la crescita del *Mycobacterium tuberculosis*.

**Reagenti:**

- Due flaconi di brodo radiometrico a pH 6 (PZA Test medium, Becton Dickinson).
- Farmaco liofilizzato (Bactec PZA drug kit, Becton Dickinson).
- Soluzione acquosa di poli-ossietilene stearato (POES) che favorisce la crescita dei micobatteri (Reconstitution Fluid, Becton Dickinson).

**Procedimento:**

- Ricostituire la pirazinamide liofilizzata aggiungendo al flacone 5 ml di soluzione di POES. Usare per l'inoculo una subcoltura in Bactec 12B avente un GI compreso fra 300 e 499.

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Qualora il GI sia  $\geq 500$  e  $< 999$  diluire la subcoltura con brodo Bactec 12B secondo lo schema riportato in tabella 11. Se invece il GI è  $\geq 999$  occorre preparare un nuovo inoculo.
- Testare preventivamente i flaconi di PZA Test Medium con lo strumento Bactec 460TB per stabilirvi un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> (scartare eventuali flaconi con GI  $\geq 20$ ).
- Aggiungere ad un flacone 0,1 ml di soluzione di pirazinamide ed, ad un secondo flacone, di controllo, 0,1 ml di soluzione di POES.
- Usando una siringa da insulina, aggiungere 0,1 ml della sospensione di inoculo sia al flacone con il farmaco che al flacone di controllo.
- Inoculare con alcune gocce della sospensione di inoculo la piastra di agar sangue e quella di 7H10.
- Incubare a 37°C.
- Esaminare le piastre di agar sangue e di 7H10, per escludere una eventuale contaminazione o la presenza di una popolazione micobatterica mista.
- Testare giornalmente i flaconi per un minimo di 4 giorni, e quando il flacone di controllo raggiunge un GI  $\geq 200$  interpretare i risultati.
- Calcolare il rapporto percentuale fra il GI del flacone col farmaco e quello del controllo. Se il GI del flacone col farmaco è inferiore al 9% del GI del flacone di controllo il ceppo deve essere considerato sensibile; se il GI del flacone col farmaco è superiore al 11% del GI del flacone di controllo il ceppo deve essere considerato resistente. Valori compresi fra 9 e 11% sono considerati *borderline*. I risultati che indicano resistenza possono essere interpretati anche se la soglia di 200 viene raggiunta in meno di quattro giorni, almeno quattro letture giornaliere sono invece indispensabili per poter interpretare risultati indicanti sensibilità. Generalmente i risultati sono disponibili in 4-7 giorni. Se il GI del controllo non raggiunge il valore di 200 entro 12 giorni occorre ripetere il test.
- Riportare la concentrazione della pirazinamide e l'interpretazione del test.

**Tabella 11. Diluizione della coltura di inoculo per l'esecuzione del test di sensibilità alla pirazinamide**

Growth Index	Volume di diluente (ml)
500 – 599	1
600 – 699	1,5
700 – 799	2
800 – 899	2,5
900 – 998	3,5

### **Controllo di qualità:**

La *performance* della pirazinamide può essere controllata utilizzando il ceppo ATCC di *Mycobacterium tuberculosis* resistente a tale farmaco o utilizzando un isolato clinico resistente. Il ceppo H37Rv (ATCC 27294) è sensibile alla pirazinamide e deve essere testato per ogni nuovo lotto di terreno e almeno una volta alla settimana; il test deve essere ripetuto in presenza di resistenza al farmaco o qualora il terreno di controllo non registri alcuna crescita.

## 6.1.5 Saggio su terreno MGIT

### **Principio:**

Recentemente è stato messo a punto il saggio della sensibilità ai farmaci antimicobatterici maggiori con il sistema MGIT. Con una sospensione micobatterica standardizzata si inoculano una serie di provette MGIT addizionate con le opportune concentrazioni dei singoli farmaci nonché una provetta MGIT di controllo, senza farmaci. Le provette vengono incubate e lette giornalmente per rilevare l'eventuale sviluppo di fluorescenza. La comparsa di fluorescenza in una provetta contenente antibiotico, entro tre giorni dalla positivizzazione della provetta di controllo, indica che il ceppo è da considerarsi resistente.

Trattandosi di una metodica introdotta di recente, manca per il momento di una completa validazione internazionale.

### **Reagenti:**

- Cinque provette MGIT (Becton Dickinson).
- Arricchimento (OADC BBL MGIT, Becton Dickinson).
- Farmaci liofilizzati (MGIT AST SIRE, Becton Dickinson) comprendenti streptomina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo.
- Una piastra di agar sangue ed una di Middlebrook 7H10.
- Controllo di positività: provetta MGIT in cui il brodo è stato sostituito con 5 ml di una soluzione di solfito di sodio allo 0,4% (conservabile a temperatura ambiente per quattro settimane).
- Controllo di negatività: provetta MGIT non inoculata.

### **Procedimento:**

#### a) Preparazione dei terreni

- Ricostituire i farmaci aggiungendo 4 ml di acqua deionizzata sterile a ciascun flacone di liofilo. Agitare fino al completo dissolvimento.
- Per ciascun test da eseguire preparare una serie di provette contenenti i singoli farmaci aggiungendo 0,1 ml di ciascuno di essi ad altrettante provette MGIT addizionate con 0,5 ml di OADC.
- Dividere in aliquote le soluzioni di farmaco non utilizzate e stoccarle a 4°C (3 giorni), a - 20°C (3 mesi) o a - 70°C (6 mesi).

#### b) Preparazione dell'inoculo

Qualora si parta da colture in terreno liquido MGIT occorre che esse siano positive da non più di quattro giorni; su quelle positive da più di quattro giorni vortexare e diluirle il brodo 1:5 con soluzione salina sterile.

Qualora si parta da terreni solidi:

- Prelevare alcune colonie rappresentative, facendo attenzione a non asportare il terreno
- Trasferire le colonie in un tubo di vetro con il tappo a vite contenente 6-10 palline di vetro e 3-4 ml di brodo Middlebrook 7H9, vortexare per vari minuti e lasciare sedimentare le particelle più grossolane per circa 20 min.
- Aspirare il supernatante e trasferirlo in una seconda provetta lasciando riposare per altri 15 min.

- Aspirare il supernatante e trasferirlo in una terza provetta aggiustando poi la torbidità della sospensione, con soluzione salina sterile, sullo standard n. 0,5 di McFarland.

Qualora si parta da una coltura in terreno radiometrico il flacone deve avere un valore di GI compreso fra 500 e 999 (sui flaconi che hanno raggiunto 999 da più di due giorni deve essere eseguita una subcoltura).

- Miscelare bene e diluire il brodo 1:5 con soluzione salina sterile.
- Inoculare con 0,5 ml di sospensione micobatterica ognuna delle provette con il farmaco nonché la provetta di controllo.
- Con alcune gocce della sospensione di inoculo eseguire delle subcolture su piastre di agar sangue e di Middlebrook 7H10.
- Incubare a 37°C.

c) Lettura ed interpretazione

- Esaminare le piastre di agar sangue e di 7H10 per verificare la purezza dell'inoculo e la presenza di un solo ceppo micobatterico.
- Leggere la provetta di controllo ogni giorno, per un massimo di 14 giorni, con un transilluminatore UV da 365 nm La provetta di controllo è da considerare positiva quando esibisce una fluorescenza più simile a quella del controllo di positività (solfito di sodio) che non a quella del controllo di negatività.
- Leggere le provette contenenti l'antibiotico per tre giorni a partire dal giorno di positivizzazione della provetta di controllo.
- Interpretare il risultato come sensibile per quegli antibiotici la cui provette non presentano fluorescenza durante i tre giorni di lettura; interpretare il risultato come resistenze per quegli antibiotici le cui provette mostrano fluorescenza al momento della positivizzazione del controllo o entro i due giorni successivi.

**Controllo di qualità:**

La performance dei farmaci può essere controllata utilizzando ceppi ATCC di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti a ciascuno dei farmaci maggiori.

## BIBLIOGRAFIA

- 1. Buttiaux R., Beerens H., Tacquet A. Micobatteri. 1980. 667-778. In: Tecniche batteriologiche. Marrapese editore. D.E.M.I. Roma.
- Canetti G., Rist N., Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogue antibacillaires par la methode des proportions. 1963. Rev. Tuberc. 27:217-272.
- Canetti G., Froman S., Grosset J., Hauduroy P., Langerova M., Mahler H.T., Meissner G., Mitchison D.A., Sula L. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. 1963. Bull. WHO. 29:565-578.
- Hacek D. Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria. 1992. In: Isenberg H.D. (Ed.). Clinical microbiology procedure handbook. 5.13.1-5.13.15. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Heifets L.B. Drug susceptibility testing. 1996. Clin. Lab. Med. 16:641-656.



## 6.2 TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI NON TUBERCOLARI A CRESCITA LENTA

### 6.2.1 MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX (MAC)

Non esistono attualmente dei metodi standardizzati per l'esecuzione dei test di sensibilità per il MAC e per i micobatteri non tubercolari in genere.

Sul test di sensibilità *in vitro* per il MAC il metodo della macrodiluizione in brodo col sistema Bactec incontra tuttavia i favori della letteratura internazionale; esso consente infatti di assicurare una certa affidabilità e riproducibilità dei risultati, la rapidità della risposta e la possibilità di saggiare le MIC di un'ampia rosa di farmaci.

Per la determinazione delle MIC, i terreni liquidi sono preferibili a quelli solidi, il terreno radiometrico in particolare; non contiene sostanze in grado di assorbire o alterare i farmaci e non contiene Tween 80, inoltre il breve periodo di incubazione richiesto dal test minimizza la possibile degradazione dei farmaci a 37°C.

La rilevazione radiometrica della crescita permette una chiara distinzione tra la cinetica di crescita nei flaconi con il farmaco e quella nel flacone di controllo.

**Tabella 12. Concentrazioni dei farmaci consigliate per il test radiometrico di sensibilità del MAC**

Farmaco	Soluzione madre (mg/ml)	Solvente / Diluente	Soluzione di lavoro (µg/ml)	Concentrazione finale (µg/ml)
Amikacina	1	acqua	320	8 - 4 - 2
Ciprofloxacina	1	acqua	160	4 - 2 - 1
Claritromicina	2,56	metanolo/acqua	1280	32 - 8 - 2
Clofazimina	1	dimetil-solfossido/acqua	20	0,5 - 0,25 - 0,125
Etambutolo	1	acqua	320	8 - 4 - 2
Rifabutina	1	metanolo/acqua	80	2 - 0,5 - 0,125
Rifampicina	1	metanolo/acqua	320	8 - 2 - 0,5
Streptomina	1	acqua	320	8 - 4 - 2
Azitromicina	10,240	etanolo/acqua	5120	128 - 32 - 8

#### Reagenti:

- Tre flaconi Bactec 12B (Becton Dickinson) per ogni farmaco da testare e due flaconi Bactec 12B da usare come controlli.
- Farmaci in soluzione alle concentrazioni indicate in tabella 12.
- Tre flaconi di fluido di diluizione (Diluting Fluid, Becton Dickinson).
- Piastre di agar sangue e di Middlebrook 7H10.
- Brodo Middlebrook 7H9.

#### Procedimento:

##### a) Preparazione dei terreni

Per ogni farmaco si devono preparare, nei solventi appropriati, le soluzioni madre alla concentrazione riportata in tabella 12 e da questa si allestiscono, con acqua distillata sterile, le diluizioni per raddoppio corrispondenti alle soluzioni di lavoro.

Per ciascun farmaco vengono testate 3 concentrazioni per raddoppio (per rifampicina, rifabutina, claritromicina ed azitromicina eseguire 5 diluizioni di lavoro scartando la 2<sup>a</sup> e la 4<sup>a</sup>).

- Aggiungere 0,1 ml di ciascuna diluizione di farmaco al corrispondente flacone.
- Prima dell'inoculo testare i flaconi 12B con lo strumento Bactec 460TB per stabilire al loro interno un'atmosfera al 5% CO<sub>2</sub> (i flaconi con GI ≥20 vengono eliminati).

b) Inoculo e lettura

- Partendo da colonie cresciute su terreno solido (è fondamentale selezionare le colonie trasparenti che sono le più virulente e resistenti) allestire una sospensione in fluido di diluizione con torbidità pari allo standard n. 1 McFarland.
- Utilizzare 0,1 ml di tale sospensione per inoculare un flacone Bactec 12B; incubarlo a 37°C e leggerlo giornalmente fino al raggiungimento di un GI = 999 (sono generalmente sufficienti 24-48 ore di incubazione).
- Diluire tale brodocoltura 1/100 con fluido di diluizione e utilizzarla per l'inoculo (0,1 ml) dei flaconi contenenti i farmaci e di uno dei flaconi di controllo.
- Eseguire un'ulteriore diluizione 1/100 di tale sospensione ed inoculare (0,1 ml) un secondo flacone di controllo.
- Incubare per un massimo di 8 giorni eseguendo quotidianamente la lettura col sistema Bactec 460TB.

Per una procedura corretta è indispensabile che il GI del controllo più concentrato non raggiunga il valore di 999 prima della 4<sup>a</sup> lettura, e che il GI del controllo più diluito superi 20 entro la 6<sup>a</sup> giornata e rimanga tale per 3 letture consecutive. Il mancato rispetto di tali norme indica un errore di inoculo, rispettivamente per eccesso e difetto, e comporta la ripetizione del test.

La prova si può considerare completata dopo che per 3 giorni consecutivi il GI del controllo più diluito si è mantenuto superiore a 20, e ogni caso, non prima della 5<sup>a</sup> giornata e non dopo la 8<sup>a</sup>.

Si considera il micobatterio sensibile a tutte le concentrazioni di farmaco contenute in quei flaconi il cui GI non abbia superato in nessuna delle letture giornaliere la soglia di 50 ed il cui incremento quotidiano di GI ( $\Delta$ GI) non sia stato superiore al corrispondente incremento registrato nel flacone del controllo più diluito.

Sulla base dei valori delle MIC riscontrate, gli isolati possono essere divisi in quattro categorie: sensibile, moderatamente sensibile, moderatamente resistente e resistente.

E' doveroso segnalare che molti autori mettono in dubbio l'esistenza di correlazione fra i risultati della sensibilità *in vitro* e la risposta del MAC alla terapia; solo per la claritromicina i valori di MIC sono stati correlati con la risposta microbiologica e clinica.

### **6.2.2 TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI A LENTA CRESCITA NON TUBERCOLARI E NON MAC**

Alcuni micobatteri a lenta crescita, non tubercolari e non MAC, sono stati associati a patologie umane. Questo gruppo comprende il *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium haemophilum*, e *Mycobacterium genavense*. E' invece estremamente rara la patogenicità per l'uomo di alcune altre specie come *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium triviale*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium gastris*, ecc.

Non esiste un unanime consenso sull'utilità dell'esecuzione dei test di sensibilità su questi micobatteri, sia per la difficoltà di decidere quali farmaci e quali concentrazioni critiche utilizzare, sia per la non chiara correlazione fra test di sensibilità *in vitro* e risposta clinica.

Limitatamente a quei micobatteri non tubercolari che presentano, nel brodo radiometrico, una cinetica di crescita sovrapponibile a quella del MAC, può essere tentato l'approccio in macrodiluzione descritto per il MAC.

### 6.3 SAGGIO DELLE ASSOCIAZIONI

L'uso razionale delle associazioni di farmaci nella terapia delle infezioni micobatteriche ha scopi diversi a seconda dell'agente eziologico responsabile dell'infezione.

Nella terapia della tubercolosi lo scopo principale dell'impiego delle associazioni è la prevenzione della comparsa della farmaco resistenza.

Nella terapia delle infezioni da MAC le associazioni di farmaci sono mirate a superare la resistenza del micobatterio ai singoli farmaci.

Negli ultimi anni, una notevole attenzione è stata rivolta alla ricerca dei sinergismi fra i farmaci usati in associazioni verso il MAC.

#### **Principio:**

Si tratta, in pratica, di determinare la più bassa concentrazione dei farmaci presenti nell'associazione, che sia capace di inibire la crescita di oltre il 99% della popolazione micobatterica, e di confrontarla con le MIC degli stessi farmaci testati separatamente.

Per poter parlare di sinergismo occorre che le MIC dei farmaci in combinazione siano almeno quattro volte più basse di quelle degli stessi farmaci impiegati singolarmente.

Il sistema radiometrico Bactec si presta particolarmente bene sia per la determinazione delle MIC che per la valutazione delle possibili attività sinergiche dei farmaci in associazione.

#### **Procedimento:**

La prima fase dell'indagine comporta la determinazione delle MIC dei singoli farmaci, utilizzando la tecnica descritta per il saggio di sensibilità del MAC, allargando il numero delle diluizioni da testare.

Per la determinazione delle eventuali attività sinergiche fra due farmaci sono richiesti dei flaconi Bactec 12B in cui i farmaci in combinazione abbiano concentrazioni finali pari a 1/2, 1/4, 1/8, delle rispettive MIC.

Si determinerà quindi la Concentrazione Inibitoria Frazionata (FIC), espressa dal rapporto tra la MIC del farmaco in associazione e quella del farmaco usato da solo.

Sommando le FIC dei vari farmaci in associazione si ricava l'Indice FIC dell'associazione, che quantifica l'interazione fra i farmaci.

Due farmaci risultano avere azione sinergica quando l'Indice FIC  $\leq 0,5$ ; hanno azione additiva quando esso è compreso fra 0,5 e 1; l'azione è indifferente se l'indice è compreso fra 1 e 2 ed è antagonista se  $\geq 2$ .

## BIBLIOGRAFIA

- Heifets L.B. Dilemmas and realities in drug susceptibility testing of *M. avium-M. intracellulare* and other slowly growing nontuberculous mycobacteria. 1991. 123-146. In: Heifets L.B. (Ed.). Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. CRC Press, Inc. Boca Raton.
- Heifets L.B. Drug combinations. 1991. 179-200. In Heifets L.B. (Ed.) Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. CRC Press, Inc., Boca Raton.

### AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Heifets L.B. Susceptibility testing of Mycobacterium avium complex isolates. 1996. Antimicrob. Agents Chemother. 40:1759-1767.
- Piersimoni C., Tortoli E., Mascellino M. T., Passerini Tosi C., Sbaraglia G., Mandler F., Bistoni F., Bornigia S., De Sio G., Goglio A., Iona E., Pasticci M.B., Simonetti M. T. Activity of seven antimicrobial agents, alone and in combination, against AIDS-associated isolates of Mycobacterium avium complex. 1995. J. Antimicrob. Chemother. 36:497 -502.
- Rastogi N., Goh K.S., Gullou N., Labrousse V. Spectrum of drugs against atypical mycobacteria: how valid is the current practice of susceptibility testing and the choice of drugs. 1992. Zentralbl. Bakteriol. 277:474-484.
- Siddiqi S.H., Heifets L.B., Cynamon M.H., Hooper N.M., Lazlo A., Libonati J.P., Lindholm-Levy P.J., Pearson N. Rapid broth macrodilution method for determination of MICs for Mycobacterium avium isolates. 1993. J. Clin. Microbiol. 31:2332-1338.

## 6.4 TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA

Sono state descritte più di 30 specie di micobatteri a rapida crescita, ma solo tre di queste, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus*, sono, con una certa frequenza, responsabili di infezioni nell'uomo. Questi micobatteri sono resistenti alla maggior parte dei farmaci antitubercolari, mentre possono essere sensibili ad alcuni farmaci non comunemente usati nei laboratori di micobatteriologia (tabella 13). L'approccio da usare per il saggio della sensibilità e l'interpretazione dei risultati sono più simili a quelli relativi agli altri batteri aerobi che non a quelli dei micobatteri a lenta crescita.

Per i test di sensibilità dei micobatteri a rapida crescita sono stati descritti quattro metodi: agar eluizione, agar diffusione, microdiluizione in brodo ed E-test; nessuno di questi metodi è stato tuttavia approvato dal NCCLS. Per la semplicità di esecuzione e per la buona correlazione con i metodi convenzionali il metodo E-test, che tuttavia necessita di ulteriori valutazioni, può trovare un facile inserimento nel laboratorio di micobatteriologia.

**Tabella 13: Criteri interpretativi dei valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )**

Farmaco	Sensibile	Moderatamente sensibile	Resistente
Amikacina	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Cefoxitina	$\leq 8$	16-32	$\geq 64$
Clarithromicina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Doxiciclina	$\leq 1$	2-8	$\geq 16$
Imipenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Tobramicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Trimetoprim-sulfometossazolo	$\leq 2/32$	-	$\geq 4/64$

### Principio

E-test è un metodo quantitativo per la determinazione della sensibilità ai farmaci consistente in una sottile striscia di plastica inerte e non porosa che presenta su una faccia una scala di lettura graduata mentre sull'altra faccia è immobilizzato, in un gradiente esponenziale predefinito, il farmaco essiccato e stabilizzato.

Quando la striscia E-test viene applicata sulla superficie inoculata di una piastra, il rilascio del farmaco dal supporto di plastica alla matrice agarizzata è immediato e un gradiente esponenziale continuo del farmaco si forma direttamente sotto la striscia di supporto.

Dopo l'incubazione, quando la crescita micobatterica si rende visibile, si può osservare un alone di inibizione ellittico, centrato lungo la striscia di plastica. Il valore di MIC, espresso in  $\mu\text{g/ml}$ , viene letto nel punto di intersezione tra il bordo dell'ellisse di inibizione e la striscia di E-test.

### Reagenti

- Strisce di E-test (AB-Biodisk) con i diversi farmaci da conservarsi a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Piastre di Mueller-Hinton agar.
- Arricchimento OADC.

### Procedimento

- Trasferire, con un'ansa sterile, delle colonie mature del micobatterio in una provetta con tappo a vite contenente acqua distillata sterile, ed omogeneizzare al vortex.

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Preparare una sospensione con torbidità di 0,5 McFarland. Depositare 2 ml di OADC sulla superficie della piastra di Mueller-Hinton arricchito con OADC, distribuendo uniformemente fino al completo assorbimento.
- Inoculare uniformemente la superficie della piastra di Mueller-Hinton con la sospensione micobatterica, usando un tampone di cotone sterile.
- Applicare le strisce E-test ed incubare le piastre in aerobiosi a 35°C per tre giorni. Interpretare le MIC in base alle indicazioni della tabella 13.
- Refertare le MIC e le relative interpretazioni.

### Controllo di qualità

Il *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) può essere utilizzato per verificare l'attività dei diversi farmaci ad eccezione della claritromicina per la quale si è dimostrato più attendibile il *Mycobacterium chelonae* (ATCC 14472).

## BIBLIOGRAFIA

- Biehle J.R., Cavalieri S.J., Saubolle M.A., Getsinger L.J. Evaluation of Etest for susceptibility of rapidly growing mycobacteria. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:1760-1764.
- Brown B.A., Swenson J. M., Wallace R.J.Jr. Agar disk elution test for rapidly growing mycobacteria. 1992. In Isenberg H.D. (Ed.). Clinical microbiology procedure handbook. 5.10.1-5.10.11. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Brown B.A., Swenson J.M., Wallace R.J.Jr. Broth microdilution MIC for rapidly growing mycobacteria. 1992. In Isenberg H.D. (Ed.). Clinical microbiology procedure handbook. 5.11.1-5.11.10. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Hoffner S.E., Klintz L., Olsson-Liljequist B., Bolmstrom A. Evaluation of Etest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum*. 1994. J. Clin. Microbiol. 32: 1846-1848.
- Wallace R.J.Jr., Daloviso J.R., Pankey G.A. Disk diffusion testing of susceptibility of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum* to antimicrobial agents. 1979. Antimicrob. Agents Chemother. 16:611-614.

## 7 TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE GENICA

Annapaola Callegaro

La necessità di disporre di una diagnostica rapida e altamente sensibile per la tubercolosi ha portato allo sviluppo di tecniche di amplificazione per la ricerca diretta del *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici, sia respiratori che extra-polmonari.

Le tecniche di amplificazione, sia *in house* che commerciali, pur essendo di recente introduzione, sono attualmente molto diffuse nei laboratori di micobatteriologia e sono oramai parte integrante della diagnostica microbiologica della tubercolosi.

L'amplificazione degli acidi nucleici (DNA o RNA) permette di ottenere, in poche ore, milioni di copie delle sequenze nucleotidiche selezionate dei micobatteri presenti nei campioni e consente quindi di ottenere risultati in poche ore a confronto delle settimane richieste dalla coltura.

Nelle tecniche di amplificazione comunemente usate per la ricerca diretta del *Mycobacterium tuberculosis* complex, l'oggetto dell'amplificazione può essere il bersaglio o la sonda.

Le tecniche orientate al bersaglio producono copie delle sequenza *target* utilizzando la stessa come stampo.

### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

La reazione a catena della polimerasi è una tecnica di amplificazione di un segmento specifico di DNA che utilizza una coppia di *primer* e la DNA polimerasi.

Usando cicli termici comprendenti una fase di denaturazione del DNA, a temperatura elevata, una fase di appaiamento dei *primer* a temperatura più bassa ed una fase di estensione del filamento, a temperatura intermedia, si realizza l'amplificazione esponenziale della sequenza bersaglio.

La PCR è sicuramente la tecnica di amplificazione più diffusa e conosciuta per la ricerca diretta del *Mycobacterium tuberculosis* e anche di altre specie di micobatteri, soprattutto il *Mycobacterium avium*.

Per la ricerca del *Mycobacterium tuberculosis* sono state utilizzate, come bersaglio, varie sequenze di DNA, le più note sono: il gene che codifica per la proteina da 65kD e la sequenza IS6110 che è presente in molte copie nel genoma.

Molti sono i dati sperimentali che riportano buoni risultati di sensibilità e specificità per la PCR *in house* non solo in campioni respiratori ma anche extra-polmonari.

Da due studi policentrici miranti a valutare l'affidabilità della PCR per la ricerca diretta del *Mycobacterium tuberculosis* sono emerse tuttavia percentuali di false positività, nei laboratori partecipanti, oscillanti fra il 3 ed il 20%, con una punta del 77%, nel primo, e fra il 5 ed il 50%, nel secondo. Questi risultati evidenziano la necessità di standardizzazione e di un rigoroso controllo di qualità.

Attualmente grazie a *kit* commerciali standardizzati, maneggevoli e capaci di contenere l'incidenza delle contaminazioni da *carry-over*, la PCR viene largamente utilizzata, accanto alle metodiche tradizionali, per la ricerca diretta del *Mycobacterium tuberculosis*.

### **Transcription Mediated Amplification (TMA)**

Utilizza una coppia di *primer* e due enzimi, trascrittasi inversa e RNA-polimerasi, per individuare l'acido nucleico bersaglio e produrre DNA a sua volta utilizzato per la trascrizione di RNA (fino a 10 miliardi di molecole in un'ora).

La TMA, essendo una reazione isoterica, non utilizza cicli termici, essa è inoltre estremamente veloce dal momento che in 15-30 min. può produrre miliardi di copie della

sequenza bersaglio, obiettivo che, con la PCR o la *ligase chain reaction*, non può essere raggiunto in meno di 3-4 ore.

Meno usate sono altre tecniche di amplificazione per la ricerca di micobatteri direttamente da campioni clinici quali la *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA), basata sulla trascrizione, e la *Strand Displacement Amplification* (SDA), basata sullo spiazzamento della sonda.

Le tecniche orientate alla sonda amplificano la sonda iniziale o una sua modificazione.

### **Ligase Chain Reaction (LCR)**

Si basa su due coppie di sonde oligonucleotidiche che ibridizzano con sequenze contigue dello stesso filamento di DNA. Tra le due sonde rimane una *gap* di pochi nucleotidi che viene colmato dalla polimerasi, successivamente la ligasi lega covalentemente tra di loro le sonde. In una reazione ciclica, utilizzando una ligasi termostabile, il prodotto che si forma serve da stampo per le successive reazioni di amplificazione.

La LCR, analogamente alla PCR, utilizza cicli termici.

La Q-beta replicasi è una reazione di amplificazione basata sulla rapida amplificazione di una sonda di RNA. Le molecole di RNA vengono utilizzate sia come sonde sia come stampi per la sintesi di nuove molecole di RNA.

## **7.1 I TEST COMMERCIALI**

### **7.1.1 Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD, GenProbe)**

#### ***Principio:***

È un test di amplificazione per la ricerca qualitativa in vitro del rRNA del *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria (espettorati, tracheo-aspirati, bronco-aspirati, bronco-lavaggi). Recentemente è stato sviluppato un test di seconda generazione allo scopo di aumentarne rapidità di esecuzione e sensibilità.

Dopo la fase iniziale di lisi delle cellule micobatteriche eventualmente presenti nel campione, ottenuta mediante sonicazione, e di denaturazione termica degli acidi nucleici, la reazione isoterma TMA amplifica a 42°C il rRNA *target*, tramite la trascrizione di molecole intermedie di DNA (figura 9). Le molecole di RNA amplificate (ampliconi) vengono fatte ibridare con una sonda specifica sfruttando la tecnica *Hybridization Protection Assay*. Questa metodica utilizza una sonda di DNA a singola elica, complementare agli ampliconi prodotti, marcata con esteri di acridinio. La sonda ibridizza e l'estere di acridinio si intercala nella doppia elica risultando quindi protetto dall'azione idrolitica di un apposito reagente. Il marcatore della sonda non legata, non intercalandosi, non risulta invece protetto e può essere facilmente distrutto. La rilevazione degli ibridi marcati RNA-DNA viene ottenuta utilizzando un luminometro. L'intera sequenza di amplificazione e rilevazione avviene in un'unica provetta, non necessita di fasi di lavaggio e si completa in meno di tre ore.

#### ***Reagenti:***

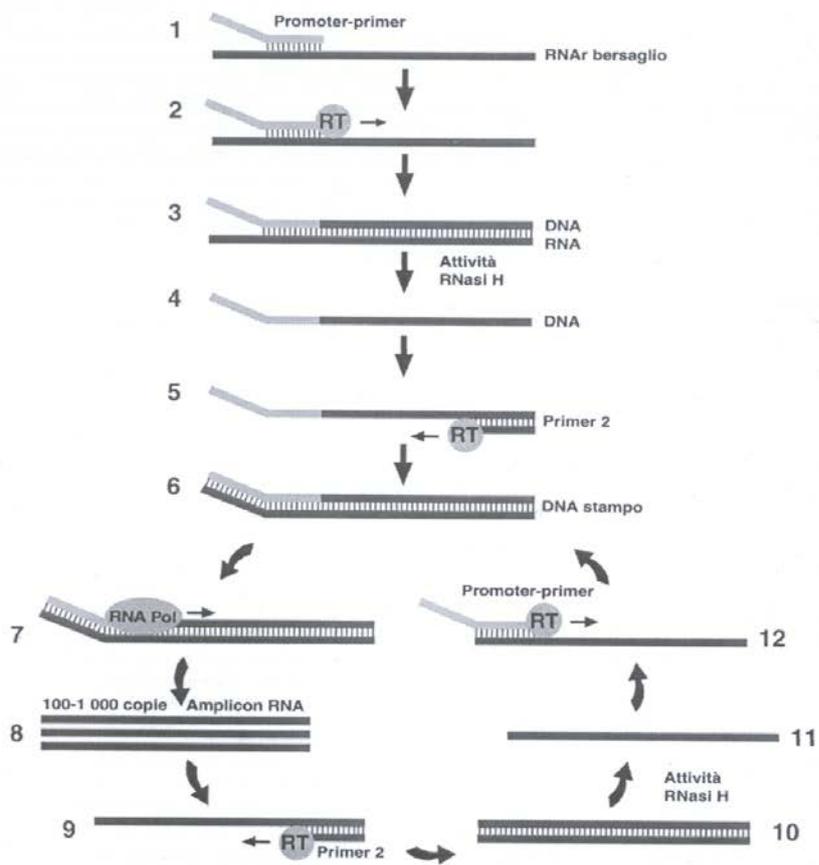
I materiali contenuti nel *kit*, necessari per l'esecuzione di 50 test, comprendono:

- Tampone di diluizione dei campioni.
- Miscela di amplificazione.
- Tampone di amplificazione.
- Olio.
- Enzima.

- Tampone di diluizione dell'enzima.
- Sonda di ibridazione.
- Tampone di ibridazione.
- Reagente di selezione.
- Tubi di lisi.

**Procedimento:**

I campioni clinici vengono sottoposti all'amplificazione MTD (figura 10) dopo essere stati decontaminati secondo le metodiche standard che utilizzano NALC-NaOH o anche NaOH soltanto.



- Fase 1: Il promoter-primer si fissa sull'RNA bersaglio  
 Fase 2: La trascrittasi inversa (RT) crea una copia DNA dell'RNA bersaglio  
 Fase 3: Doppia elica RNA / DNA  
 Fase 4: L'attività RNasi H della trascrittasi inversa degrada l'RNA  
 Fase 5: Il primer 2 si fissa sul DNA e la trascrittasi inversa genera una nuova copia di DNA  
 Fase 6: DNA stampo a doppia elica con una sequenza promoter  
 Fase 7: L'RNA polimerasi (RNA pol) inizia la trascrizione dell'RNA partendo da DNA stampo  
 Fase 8: Vengono prodotte da 100 a 1000 copie di RNA amplicon  
 Fase 9: Il primer 2 si fissa su ogni amplicon e la trascrittasi inversa genera una copia di DNA  
 Fase 10: Doppia elica RNA / DNA  
 Fase 11: L'attività RNasi H della trascrittasi inversa degrada l'RNA  
 Fase 12: Il promoter-primer si fissa sulla catena di DNA di nuova creazione. La trascrittasi inversa crea una doppia elica di DNA ed il ciclo auto-catalitico ricomincia, dando luogo ad una amplificazione di parecchi miliardi di volte

**Figura 9**

Sono state tuttavia utilizzate, con buoni risultati, anche altre procedure di decontaminazione, quali quella che impiega dodecil-solfato di sodio-NaOH.

Dopo la decontaminazione i campioni concentrati possono essere conservati a -20° o a -80°C per mesi, purché non vengano scongelarli e ricongelarli più volte (se si prevede di dover utilizzare più volte i campioni conviene congelarli in aliquote).

Per prevenire contaminazioni è molto importante, all'inizio e alla fine della procedura, pulire le superfici dei banchi di lavoro, gli strumenti e le pipette con una soluzione di ipoclorito allo scopo di distruggere eventuali residui di RNA formatosi in amplificazioni precedenti.

- Aggiungere a 450 µl di sedimento del campione decontaminato 50 µl di tampone di diluizione. Sonicare per 15 min.
- Dispensare (sotto cappa), in un tubo di polipropilene, 50 µl di miscela di amplificazione precedentemente ricostituita, aggiungervi 200 µl di olio e successivamente, sul fondo della provetta al di sotto dell'olio, 25 µl di campione sonicato.
- Incubare per 15 min. a 95°C, in un termostato a secco o in bagnomaria, per la inattivazione del campione.
- Trasferire la provetta in termostato a 42°C, aggiungervi 25 µl di enzima di amplificazione, e incubare a 42°C per 30 min.

L'enzima una volta ricostituito è stabile a 2-8°C per un mese oppure per vari mesi a -20° o -80° C.

Dopo la fase di amplificazione è possibile interrompere la procedura e conservare i campioni a 2-8°C per 2 ore o a -20°C *overnight*.

Lavorando in una zona diversa rispetto alla precedente aggiungere ai campioni 100 µl di sonda di ibridazione ricostituita (si conserva a 2-8°C per un mese).

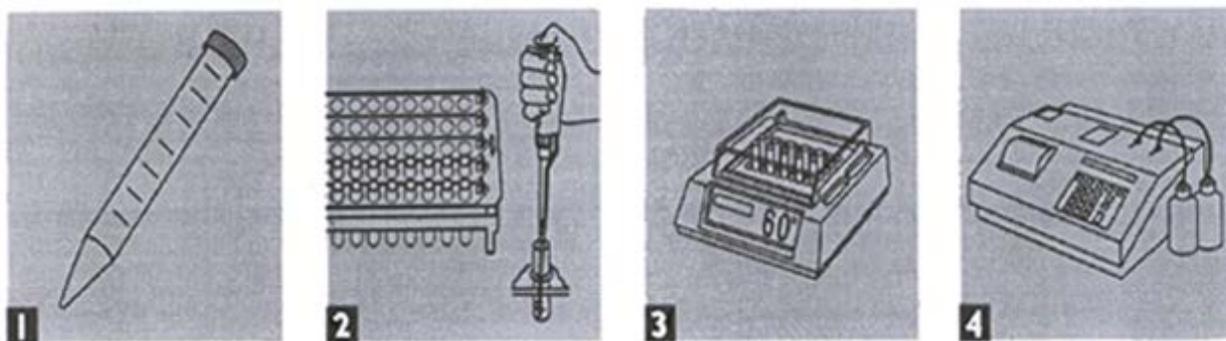
- Vortexare e incubare a 60°C per 15 min. per permettere l'ibridazione tra gli ampliconi di RNA e la sonda di DNA.
- Aggiungere 300 µl di reagente di selezione e incubare a 60°C per 15 min.
- Leggere i campioni al luminometro: si considerano negativi valori di RLU (relative light unit) <30000 e positivi valori di RLU >30000. I campioni con valori di RLU compresi tra 30000 e 500000 dovrebbero essere ritestati.

La metodica si riferisce al test MTD di II generazione, le differenze rispetto al test di I generazione sono riportate in tabella 14.

### **Controllo di qualità:**

La procedura prevede l'inserimento di controlli, positivi e negativi, di lisi e di amplificazione.

I controlli di qualità non vengono forniti con il *kit*. Possono essere preparati in laboratorio utilizzando un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177 o 27294) come controllo positivo ed uno di *Mycobacterium gordonae* (ATCC 14470) o di *Mycobacterium terrae* (ATCC 15755) come controllo negativo; si parte da una colonia e la si stempera e diluisce in acqua distillata sterile. E' anche possibile procurarsi dalla ditta produttrice i controlli di RNA positivo e negativo: per questo tipo di controlli la provetta iniziale di lisi non viene sonicata. Si considerano accettabili valori <20000 RLU per il controllo negativo e valori >500000 RLU per il controllo positivo.



**1** Preparazione del campione

- Distribuire il reattivo di amplificazione nella provetta di reazione
- Aggiungere il campione preparato o il controllo di amplificazione
- Incubare 15 minuti a 95°C

**2** Amplificazione

- Aggiungere il reattivo enzimatico
- Incubare 30 min a 42°C

**3** Ibridazione

- Aggiungere il reattivo sonda
- Incubare 15 minuti a 60°C
- Aggiungere il reattivo di selezione
- Incubare 15 minuti a 60°C

**4** Rivelazione

- Leggere i risultati con il luminometro Gen-Probe.

**Figura 10**

Qualora MTD risulti negativo in presenza di forte sospetto clinico di tubercolosi o di esame colturale positivo per *Mycobacterium tuberculosis*, è consigliabile verificare la presenza di inibitori dell'amplificazione nel campione; il controllo dell'inibizione si esegue ripetendo il test con l'aggiunta, a 450 µl di campione, di 50 µl di controllo positivo. Se il risultato del test rimane negativo risulta confermata la presenza di inibitori.

**Tabella 14. Differenze fra le tecniche MTD di I e II generazione**

Reagenti	MTD I	MTD II
Tampone di diluizione del campione	200 µl	50 µl
Campioni/controlli	50 µl	450 µl
Reagente di amplificazione	25 µl	50 µl
Campione sonicato per l'amplificazione	50 µl	25 µl
Tempo di amplificazione a 42°C	2 ore	30 min.
Controlli di ibridazione	negativo e positivo	nessuno
Tempo di selezione a 60°C	10 min.	15 min.

**7.1.2 LCx *Mycobacterium tuberculosis* (Abbott)**

**Principio:**

E' un test di amplificazione che utilizza la reazione a catena della ligasi (LCR) e il sistema MEIA per la ricerca, in circa quattro ore, di DNA del *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria.

L'amplificazione avviene mediante una serie di cicli termici. Il *target* è una sequenza di DNA (dal nucleotide 347 al 390) all'interno del gene in singola copia che codifica per l'antigene proteico b del *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Due coppie di sonde oligonucleotidiche si legano a sequenze specifiche dei due filamenti di DNA; l'intervallo di nucleotidi rimanente fra le sonde viene colmato dalla polimerasi ed il legame è reso stabile dalla ligasi.

L'amplicone neoformato, complementare alla sequenza originale, serve da stampo per i cicli di amplificazione successiva.

Per il rilevamento dell'amplicato viene utilizzato un dosaggio immuno-enzimatico a cattura di microparticelle (MEIA) che si svolge in maniera automatica all'interno dell'analizzatore LCx. Le sonde oligonucleotidiche sono marcate in modo tale che i prodotti di amplificazione abbiano ad una estremità un aptene di cattura e all'altra un aptene di rilevazione. All'interno dello strumento LCx delle microparticelle rivestite di anticorpi anti-aptene di cattura, si legano agli ampliconi e alle sonde non legate marcate con tale aptene. La miscela viene trasferita su una matrice di fibra di vetro a cui le microparticelle si legano irreversibilmente. Nella successiva fase di lavaggio vengono rimosse tutte le sonde libere marcate con l'aptene di rilevazione. Nella incubazione che segue anticorpi anti-aptene di rilevazione, coniugati con fosfatasi alcalina, si legano ai prodotti di amplificazione dando luogo, in seguito all'aggiunta di un substrato fosforilato, alla produzione di un composto fluorescente rilevato da sistema ottico.

### **Reagenti:**

I materiali contenuti nel *kit*, che permettono l'esecuzione di 96 test, comprendono:

- Provette di preparazione dei campioni respiratori (contenenti palline di vetro e tampone).
- Tampone per la risospensione dei campioni.
- Provette di amplificazione contenenti sonde, enzimi (polimerasi e ligasi) e nucleotidi.
- Controlli negativo e positivo (calibratore).
- Reagente di attivazione dei controlli.
- Pacchetto di rivelazione contenente: microparticelle rivestite di anticorpo anti-aptene di cattura, anticorpo anti-aptene di rilevazione coniugato con fosfatasi alcalina, substrato per la rivelazione e chelante metallico.
- Diluente di inattivazione (soluzione acquosa di perossido di idrogeno).
- Diluente del sistema (tampone tris-acetato).

Il sistema LCx per il dosaggio del *Mycobacterium tuberculosis* complex necessita, oltre al *thermal cycler*, di un analizzatore LCx, un sonicatore, una microcentrifuga ed un blocco riscaldante coperto.

### **Procedimento:**

La procedura deve essere eseguita in due aree separate, una per la preparazione del campione e dei controlli ed una per l'amplificazione e la rivelazione. Ciò allo scopo di ridurre la possibilità, reale quando si lavora con tecniche di amplificazione del DNA, di contaminazione con prodotti di precedenti amplificazioni.

- Dispensare 500 µl di campione, decontaminato con NaOH o con NALC-NaOH, nell'apposita provetta di preparazione e centrifugare a 1500 x g per 10 min.
- Rimuovere il supernatante, dispensare 1 ml di tampone di risospensione, vortexare e centrifugare a 1500 x g per 10 min.

- Eliminare nuovamente il supernatante facendo attenzione a non rimuovere il sedimento e aggiungere 500 µl di tampone di risospensione. Questa procedura di lavaggio serve per rimuovere eventuali inibitori presenti nei campioni. I campioni possono essere conservati a 15-30°C per 1 ora o a 2-8°C per 4 giorni.
- Inattivare i campioni nel blocco riscaldante a 95°C (+/- 2°) per 20 min. Dopo essere stati raffreddati per 10 min. sonicare i campioni; il DNA viene rilasciato e rimane accessibile agli enzimi e agli altri componenti della reazione.
- Raffreddare per 5 min. e centrifugare per 2 min. a >9.000 x g. I campioni possono essere conservati a 2-8°C per 7 giorni.
- Trasferire 100 µl di supernatante in una provetta contenente 100 µl di miscela di amplificazione. Le provette vengono trasferite nel *thermal cycler* (area 2) e sottoposte a 37 cicli (94°C per 1s, 64°C per 1 s, e 69°C per 40 s). Attivare il calibratore ed il controllo e sottoporli all'amplificazione assieme alle provette dei campioni. Al termine dell'amplificazione i campioni possono essere conservati a 15-30°C per 72 ore.
- Centrifugare per 10-15 s e procedere alla fase di rilevazione all'interno della strumentazione automatica LCx. Il *cut-off* del sistema è pari al 30% della media dei valori di fluorescenza dei due calibratori.

**Controllo di qualità:**

La procedura prevede che i valori del controllo negativo e del calibratore rientrino in un intervallo prefissato.

E' bene inserire un controllo positivo che monitorizzi l'intera procedura analitica ed un controllo negativo che monitorizzi la contaminazione da DNA. Il controllo positivo può essere preparato con un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra.

**7.1.3 Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* e Cobas Amplicor (Roche)**

**Principio:**

E' un test di amplificazione mediante PCR per la determinazione qualitativa di *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria.

Il sistema Cobas Amplicor utilizza per l'amplificazione e la rivelazione del DNA una strumentazione automatica.

Il *target* è una sequenza di 584 bp del gene che codifica per il 16S rRNA (figura 11); si tratta di una sequenza genere-specifica altamente conservata. I *primer* biotinilati si legano al DNA bersaglio e la Taq polimerasi, in presenza di nucleotidi (desossiadenosina, desossiguanosina, desossicitidina e desossiuridina) in eccesso, estende i *primer*.

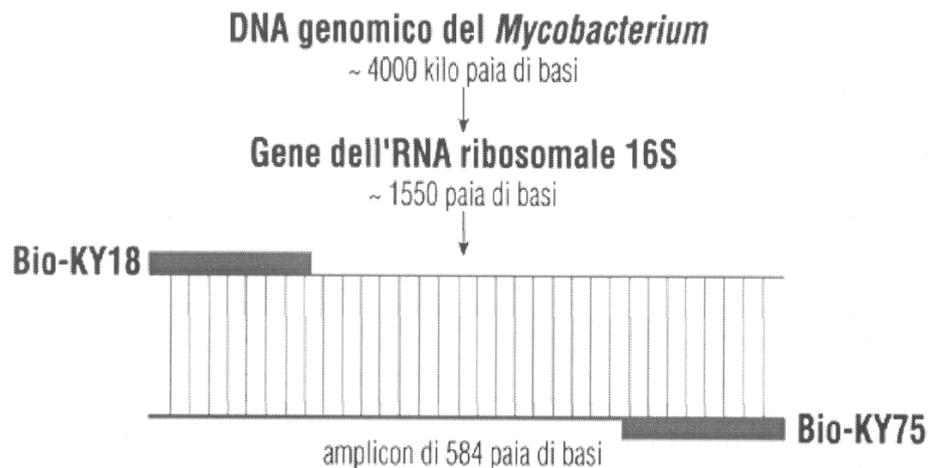
Il sistema AmpErase contiene l'enzima uracile-N-glicosilasi che catalizza la reazione di distruzione del DNA contenente desossiuridina. La desossiuridina, che non è presente nel DNA naturale, si ritrova nel DNA amplificato poiché è contenuta nella miscela di amplificazione al posto della timidina. L'impiego de AmpErase sul campione, prima dell'inizio della reazione di amplificazione, elimina eventuali contaminazioni dovute ad ampliconi di sedute precedenti. Per evidenziare la presenza di eventuali inibitori che possono interferire con la reazione di amplificazione, è stato aggiunto un controllo interno costituito da DNA plasmidico con regioni di legame per i *primer* uguali a quelle della sequenza del *Mycobacterium tuberculosis* e con sequenza interna simile; esso possiede inoltre un sito di legame per una sonda specifica. Dopo l'amplificazione l'amplificato denaturato viene fatto ibridizzare con una sonda che riconosce una sequenza *Mycobacterium tuberculosis* complex-specifica presente nella parte ipervariabile del gene codificante per il rRNA 16S. Un enzima coniugato con avidina-perossidasi si lega

all'amplicone biotinilato a sua volta catturato dalle sonde specifiche immobilizzate ai pozzetti della micropiastra (nel *kit* Cobas AmpliCor le sonde oligonucleotidiche specifiche per *Mycobacterium tuberculosis* complex e per il controllo interno ricoprono la superficie di particelle magnetiche). L'aggiunta di un substrato cromogeno determina la formazione di un complesso colorato.

**Reagenti:**

Il *kit* comprende tutto il necessario per l'esecuzione di 96 test:

- Soluzione di lavaggio dei campioni.
- Reagente di lisi per i campioni.
- Reagente di neutralizzazione dei campioni. Provette per il pretrattamento dei campioni.
- Provette di amplificazione.
- MasterMix (contenente Taq polimerasi, nucleotidi e *primer* biotinilati).
- AmpErase.
- Controllo interno.
- Controllo negativo.
- Controllo positivo.
- Micropiastra con sonda adesiva (nel *kit* AmpliCor) o sonda in sospensione (nel sistema Cobas AmpliCor).
- Soluzione denaturante.
- Tampone di ibridizzazione.
- Coniugato avidina-perossidasi.



**Figura 11.** La sequenza bersaglio di DNA usata nel test AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* è un segmento di 984 paia di basi, comune a tutte le specie di *Mycobacterium*, situato nel gene del RNA ribosomiale 16S

- Substrato (due soluzioni da miscelare prima dell'uso).
- Reagente di arresto (solo nel *kit* Amplicor).
- Soluzione di lavaggio.

**Procedimento:**

Nell'area 1 (di preparazione dei reagenti):

- Pipettare 100 µl di AmpErase e 100 µl di controllo interno in una confezione di MasterMix e agitare bene.
- Trasferire 50 µl della miscela suddetta nelle provette di amplificazione e conservarle, una volta tappate e chiuse in un sacchetto di plastica, a 2-8°C, nell'area 2.

Nell'area 2 (di preparazione dei campioni):

- Dispensare 500 µl di soluzione di lavaggio nelle provette per i campioni e aggiungere 100 µl di campione decontaminato e ben vortexato.
- Centrifugare a 12500 x g per 10 min.
- Aspirare il supernatante e aggiungere al sedimento 100 µl di reagente di lisi.
- Preparare i controlli dispensando in due provette 400 µl di reagente di lisi e, rispettivamente, 100 µl di controllo negativo e 100 µl di controllo positivo; vortexare a lungo.
- Pipettare 100 µl di ciascun controllo in una provetta di amplificazione da processare parallelamente ai campioni clinici.
- Incubare campioni e controlli in un blocco termostato a 60°C per 45 min., vortexando dopo 10 min.
- Dopo l'incubazione aggiungere 100 µl di reagente di neutralizzazione a ciascuna provetta.
- Trasferire 50 µl di campione e dei controlli positivo e negativo nelle provette contenenti la soluzione di amplificazione e portarli nell'area 3; i campioni così preparati possono essere conservati a 2-8°C per 8 ore.

Nell'area 3 (di amplificazione e rivelazione):

- amplificare (37 cicli in 2 ore) e quindi aggiungere 100 µl di soluzione denaturante alle provette che vengono poi incubate per 10 min. a temperatura ambiente. A questo punto si può procedere alla rivelazione entro un'ora oppure si possono conservare i campioni a 2-8°C per 1 settimana.
- Dispensare in ogni pozzetto della micropiastra 100 µl di tampone di ibridazione e aggiungere 25 µl di ciascun campione o controllo; incubare a 37°C per 90 min.
- Lavare per 5 volte con 400 µl di soluzione lasciandola agire per 30 s tra un lavaggio e l'altro.
- Aggiungere 100 µl di coniugato e incubare a 37°C per 15 min.
- Dopo cinque ulteriori lavaggi aggiungere 100 µl di substrato e incubare a temperatura ambiente, al buio, per 10 min.

- Bloccare la reazione con 100 µl di soluzione di arresto e leggere la densità ottica a 450<sub>A</sub> entro un'ora. Il risultato positivo o negativo è determinato in rapporto ad un *cut-off* di 0,350.

Nel sistema Cobas Amplicor le fasi di amplificazione e rivelazione vengono eseguite automaticamente all'interno dello strumento Cobas.

#### **Controllo di qualità:**

In ogni seduta si devono inserire un controllo positivo e tre controlli negativi. Il controllo positivo deve dare una densità ottica  $\geq 2$ , ogni controllo negativo deve risultare  $< 0,25$ . Per controllare la procedura di preparazione del campione è necessario inserire un controllo preparato partendo da una coltura di *Mycobacterium tuberculosis*.

## **7.2 USO CLINICO DEI TEST DI AMPLIFICAZIONE**

I test commerciali sopra descritti possono individuare *Mycobacterium tuberculosis* in poche ore e hanno dimostrato una buona sensibilità e specificità considerando come gold standard la combinazione di esame colturale e diagnosi clinica.

I due test presenti da più tempo in commercio, MTD e Amplicor, hanno dimostrato, in alcuni studi di comparazione, risultati simili e una sensibilità oscillante fra il 70 ed il 95%.

MTD di seconda generazione, commercializzato recentemente, ha evidenziato maggior sensibilità rispetto a MTD di prima generazione soprattutto in campioni microscopico-negativi e in campioni extra-polmonari, ma pare anche caratterizzato da maggiore sensibilità all'azione degli inibitori.

In studi multicentrici americani ed europei LCx (Abbott) ha dimostrato sensibilità e specificità variabili fra il 93.7% e il 99.2% e fra il 95% e il 99.3% rispettivamente; buoni risultati sono stati ottenuti anche per la ricerca diretta del *Mycobacterium tuberculosis* in campioni extra-polmonari. Per quanto riguarda la versione automatizzata Cobas Amplicor MTB uno studio recente ha riportato sensibilità e specificità rispettivamente del 83% e del 99%.

Sebbene la sensibilità dei test di amplificazione non sia superiore a quella della coltura essi presentano il vantaggio di permettere l'identificazione del *Mycobacterium tuberculosis* in tempi estremamente più rapidi.

La velocità e l'accuratezza della diagnosi di tubercolosi influiscono in maniera positiva sulla gestione della malattia tubercolare permettendo una minore diffusione dell'infezione e una riduzione dei costi associati alla diagnosi e alla terapia. Identificare rapidamente il *Mycobacterium tuberculosis* diventa estremamente importante nei pazienti HIV-positivi e negli immunodepressi in genere. In questi pazienti sono frequenti anche infezioni da altri micobatteri, soprattutto da *Mycobacterium avium*, e dal momento che l'esame microscopico non permette di distinguere tra le varie specie micobatteriche, i test di amplificazione possono risultare determinanti per una veloce ed accurata diagnosi di malattia tubercolare.

## **7.3 PROBLEMATICHE DELLE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE**

Le tecniche di amplificazione per la ricerca del *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campione, pur dando un importante contributo alla diagnostica microbiologica della tubercolosi, portano con sé alcune problematiche ancora irrisolte.

Vi possono essere dei risultati falsamente positivi dovuti alla possibile contaminazione da acidi nucleici amplificati precedentemente. L'estrema sensibilità di queste tecniche rende teoricamente possibile la contaminazione anche da parte di un unico amplicone. La maggior parte dei *kit* commerciali contengono tuttavia dei sistemi che permettono di controllare l'incidenza delle contaminazioni.

Le cause dell'inibizione dell'amplificazione non sono ancora completamente note. La corretta preparazione del campione ed in particolar modo le fasi di lavaggio, soprattutto dei campioni

extra-polmonari, costituiscono i punti critici per la riduzione della quantità degli inibitori dell'amplificazione.

L'interpretazione clinica dei risultati ottenuti con i test di amplificazione può talvolta rappresentare una sfida. I test positivi all'amplificazione e negativi alla coltura vengono, in prima battuta, considerati dei falsi positivi; la risoluzione dei dati discrepanti deve essere fatta considerando la coltura e la clinica insieme al fine di poter validare un metodo di amplificazione prima di utilizzarlo routinariamente per la diagnosi.

Dato che l'amplificazione degli acidi nucleici, soprattutto del DNA, coinvolge anche i micobatteri morti risulta particolarmente difficile l'interpretazione del risultato nei pazienti in terapia.

## BIBLIOGRAFIA

- Bennedsen J., Thomson V.O., Pfyffer G.E., Funke G., Feldman K., Beneke A., Jenkins P.A., Hegginkbothom M., Fahr A., Hengstler M., Cleator G., Klapper P., Wilkins E.G.L. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. 1996. J. Clin. Microbiol. 34:1407-1411.
- Bodmer T., Gunter A., Scholkmann M., Matter L. Evaluation of the COBAS AMPLICOR MTB system 1997. J. Clin. Microbiol. 35:1604-1605.
- Callegaro A., Blasi M., Chirillo G., De Santis A., Mandler F., Montini G., Osenda F., Penati V., Piersimoni C., Predominato M., Riva R., Scarparo C. Evaluation of second generation Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test in respiratory and extra-respiratory specimens. 1997. Abstract in: 18<sup>th</sup> Annual Congress of European Society for Mycobacteriology. Cordoba (Spain).
- Carpentier E., Drouillard B., Dailloux M., Moinard D., Vallee E., Dutilh B., Maugein J., Bergogne-Bérézin E., Carbonelle B. Diagnosis of tuberculosis by Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:3106-3110.
- Clarridge J.E., Shower R.M., Shinnick T.M., Plikaytis R.B. Large-scale use of polymerase chain reaction for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. 1993. J. Clin. Microbiol. 31:2049-2056.6)
- Dalovisio, J.R., Montenegro James S., Kemmerly A., Genre C.F., Chambers R., Greer D., Pankey G.A., Failla D.M., Haydel K.G., Hutchinson L., Lindley M.F., Nunez B.M., Praba A., Eisenach K.D. Cooper E.S. Comparison of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. 1996. Clin. Infect. Dis. 23:1099-1106.
- D'Amato R.F., Wallaman A.A., Hochstein L.H., Colaninno P.M., Scardamaglia M., Ardila E., Ghouri M., Kim K., Patel R.C., Miller A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. J. Clin. Microbiol. 33:1832-1834.
- Gamboa F., Dominguez J., Padilla E., Manterola J.M., Gazapo E., Lonca J., Matas L., Hernandez A., Cardona P.J., Ausina V. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. 1998. J. Clin Microbiol. 36:1324-1329.

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Gamboa F., Fernandez G., Padilla E., Manterola J.M., Lonca J., Matas L., Cardona P.J., Matas L., Ausina V. Comparative evaluation of initial and new version of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. 1998. J. Clin. Microbiol. 36:684-689.
- Lecky G.W., Erickson D.D., He Q., Facey I.E., Lin B., Cao J., Halaka F.G. Method for reduction of inhibition in a *Mycobacterium tuberculosis* specific ligase chain reaction DNA amplification assay. 1998. J. Clin. Microbiol. 36:764-766.
- Moore D.F., Curry J.I. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction. 1998. J. Clin. Microbiol. 36:1028-1031.
- Pfyffer G.E. Amplification techniques: hope or illusion in the direct detection of tuberculosis? 1994. Med. Microbiol. Lett. 3:335-347.
- Pfyffer G.E., Kissling P., Jahn E.M.I, Welscher H.M., Salfinger M., Weber R. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other non respiratory, and respiratory specimens. 1996. J. Clin. Microbiol. 34:834-841.
- Piersimoni C., Callegaro A., Nista A., Bornigia S., De Conti F., Santini G.F. De Sio G. Comparative evaluation of two commercial amplification assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:193-196.
- Rajalahti H., Vuorinen P., Nieminen M., Miettinen A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex specimens by automated Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. 1998. J. Clin. Microbiol. 36:975-978.
- Noordhoek G.T., Kolk A.H.J., Biune G., Catty D., Dale J.W., Fine P.E.M., Godfrey-Fausset P., Cho S.N., Shinnick T., Svenson S.B., Wilson S., van Embden J.D.A. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. A blind comparison study among seven laboratories. 1994. J. Clin. Microbiol. 32:277-284.
- Noordhoek G.T., van Embden J.D.A., Kolk A.H.J. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. 1996. J. Clin. Microbiol. 34:522-525.
- Tortoli E., Lavinia F., Simonetti M.T. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. 1997. J. Clin. Microbiol. 35:2424-2426.
- Vuorinen P., Miettinen A., Vuento R., Hallstrom O. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. 1995. J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859.

## 8 SIEROLOGIA

Andrea Cuboni, Daniela Marchetti

### 8.1 GENERALITÀ

La sierologia della tubercolosi, che indaga lo stato della risposta anticorpale specifica in un soggetto affetto da tale patologia, può costituire un efficace strumento diagnostico a costi molto contenuti e con una praticità e facilità d'uso notevole. Essa si affianca alle indagini microscopiche e colturali, ma talora, come in alcune forme extra-polmonari, può essere l'unico sostegno alla diagnosi e far propendere per una tempestiva terapia. Tuttavia, attualmente, la sierologia è poco usata per la diagnosi di tubercolosi, e ciò anche a causa di oggettive limitazioni. Di primaria importanza è il problema della specificità: i micobatteri hanno un gran numero di antigeni, ed alcuni di essi sono comuni ad altri generi batterici (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*) e protozoi (*Leishmania*), o ad antigeni umani (HSP 65).

Le preparazioni antigeniche globali o parzialmente purificate consentono buone risposte nei test sierologici, grazie al contenuto di antigeni immunodominanti, ma sono gravate da una bassa specificità che riduce l'utilità dei risultati ottenuti. La ricerca, tuttavia, isola e testa continuamente nuovi antigeni tanto che si è giunti a specificità vicine al 100%, la sensibilità rimane però ancora bassa: 30 - 50 %.

La sensibilità non può prescindere dal fatto che circa il 20% dei malati di tubercolosi non producono anticorpi dimostrabili con i vari test sierologici.

Vi sono al proposito varie ipotesi: è noto che costituenti o prodotti del *Mycobacterium tuberculosis*, o sostanze derivate dall'interazione con l'ospite all'inizio della malattia, hanno effetti immunodepressori; sono stati inoltre dimostrati antigeni micobatterici circolanti nella maggior parte dei malati che, formando immunocomplessi con i relativi anticorpi, potrebbero rendere questi ultimi indisponibili per l'evidenziazione *in vitro*; non si dimostrano inoltre anticorpi nei soggetti con buona immunità cellulo-mediata (i quali hanno una prognosi più favorevole ed una migliore risposta alla terapia).

Un altro problema è rappresentato dalle false positività riscontrate in soggetti guariti da tempo, o in soggetti a contatto con malati di tubercolosi; l'anamnesi permette in questi casi di chiarire la situazione.

Da studi di comparazione fra antigeni diversi è emerso che pazienti con test negativo per un antigene possono essere positivi con un altro, o con più altri; l'indicazione per un buon test sierologico è quindi per un test con un pannello di antigeni, immunodominanti, naturali o sintetici.

Si consideri, poi, che i test sierologici danno risultati migliori nei paesi in via di sviluppo, dove vi è una più elevata prevalenza di malattia; nei paesi industrializzati, dove la tubercolosi è endemica da secoli, si è selezionata invece una popolazione con buona immunità cellulo-mediata e con bassa produzione anticorpale.

Anche il fatto che la miglior risposta diagnostica per i test sierologici si abbia dopo almeno tre mesi di malattia contribuisce a spiegare i migliori risultati ottenuti nei paesi in via di sviluppo, dove il ricorso al medico avviene in genere più tardivamente.

E' quindi consigliabile, nei casi dubbi, di ripetere il test a distanza di tempo. A questo proposito si consiglia, per valutare un test sierologico proposto commercialmente, di consultare la letteratura per appurare se la sperimentazione è stata condotta in un paese in via di sviluppo, il che farebbe attendere risultati meno favorevoli.

Un caratteristica comune ai vari test sierologici, di cui non è nota la causa, è che la sensibilità risulta regolarmente inferiore nei casi negativi all'esame microscopico, rispetto ai casi positivi.

I test basati su antigeni meno specifici sono caratterizzati da false positività in corso di malattie non tubercolari: a parte una certa reattività crociata con altre micobatteriosi, sono

segnalate positività con varie malattie infettive (nocardiosi, leishmaniosi), con malattie polmonari non tubercolari (neoplasie), con artrite reumatoide e con altre malattie da auto-immunità. In genere, tuttavia, le ditte produttrici segnalano queste circostanze, sempre riportate anche nella letteratura che conviene consultare prima di adottare un test. La conoscenza delle più frequenti cause di riduzione della specificità risulta di notevole aiuto nella valutazione dei risultati.

Si ritiene che un test sierologico ideale per la tubercolosi debba avere una sensibilità almeno del 70%, ed una specificità del 99%; nessun test attualmente ha queste caratteristiche; d'altronde, numerosi altri test di laboratorio sono lontani dalle caratteristiche ideali e vengono, col tempo, migliorati o sostituiti. Ciò non toglie che vengano largamente usati per quello che possono dare.

Se è vero che è l'elevata specificità a rendere più utile un test sierologico per la tubercolosi, è altresì vero che essa si accompagna per ora una bassa sensibilità, per giunta ancora più bassa nei paesi industrializzati.

Un test a bassa specificità, ma con buona sensibilità, può pertanto avere ancora un suo ruolo purché i risultati vengano valutati con la dovuta cautela. Sebbene pochissimo si parli del ruolo della sierologia nella diagnosi di tubercolosi, o se ne parli come di una possibilità allo studio, di non sicura utilità, laddove i test sierologici sono eseguiti routinariamente, dopo un certo periodo, necessario perché i clinici stabiliscano la loro personale correlazione fra risultati e diagnosi definitiva, questi test entrano a pieno titolo fra le procedure diagnostiche, e contribuiscono a ridurre i costi della diagnosi, ad instaurare più tempestivamente una terapia e, talora, a risolvere in maniera decisiva quesiti diagnostici difficili.

## 8.2 LE VARIE CLASSI IMMUNOGLOBULINICHE

La diagnosi sierologica delle infezioni da micobatteri è oggi focalizzata sulla ricerca di anticorpi IgG, IgM ed IgA, mediante l'utilizzo di antigeni sintetici o estrattivi.

La cinetica di comparsa di IgG, IgM ed IgA rispecchia quanto accade nelle più comuni malattie infettive, comparando di norma prima la risposta immune IgM, seguita poi da IgG ed IgA, quasi contemporaneamente.

Tuttavia i tempi di positivizzazione, la permanenza e la negativizzazione del titolo anticorpale presentano generalmente caratteristiche non sempre sovrapponibili a quelle riscontrate in altre infezioni e ciò a causa delle complesse interconnessioni esistenti, nell'infezione tubercolare, tra immunità umorale e immunità cellulo-mediata.

E' necessaria una certa prudenza nella valutazione dei dati ottenuti dai test immunosierologici, sia per le difficoltà di identificazione della fase dell'infezione (tempo intercorrente tra contatto, comparsa dei sintomi e presentazione del paziente al medico) sia per la diversa reattività individuale e infine per il tipo di antigene impiegato.

La risposta IgM si evidenzia per prima nel corso di infezione tubercolare; è stata rilevata infatti nel 45-50% dei pazienti affetti da patologia tubercolare acuta, al momento dell'ingresso in ospedale; nel 10% dei soggetti venuti a contatto con pazienti affetti da tubercolosi attiva e nella popolazione sana sottoposta di recente a stimolazione specifica con tubercolina.

E' spesso difficile poter stabilire il momento di inizio della malattia. Il periodo di incubazione può essere lungo e tra la comparsa dei primi sintomi e il momento della diagnosi possono intercorrere settimane o mesi, tanto che non è infrequente, ad un primo esame, il mancato rilevamento della positività IgM.

Il rilievo di anticorpi IgM è molto più frequente nei casi di primo accertamento rispetto alle recidive; nelle infezioni post-primarie e nelle forme extra-polmonari le IgM possono anche non essere rilevabili.

Le IgM permangono per un massimo di 6-9 mesi e al loro decremento segue solitamente la positivizzazione della risposta immune di tipo IgG.

E' doveroso segnalare al proposito che la presenza nel siero di fattore reumatoide o di anticorpi anti-nucleo può dar luogo a false positività, e che alte concentrazioni di IgG possono

nascondere la presenza di IgM specifiche (l'assorbimento delle IgG può in alcuni casi rilevare una positività altrimenti non determinabile).

Mentre la positività della sola risposta IgM, senza contemporanea presenza di IgG, deve essere valutata attentamente e controllata nel tempo, il rilevamento di IgM associate ad IgG o ad IgA avvalorano l'ipotesi di infezione attiva o recente.

Le IgG specifiche sono presenti molto spesso al primo accertamento dopo l'esordio della sintomatologia clinica con valori generalmente non molto elevati e possono aumentare durante la terapia antitubercolare, sia per il naturale sviluppo della risposta immunitaria, sia per l'incremento della massa antigenica rappresentata dai micobatteri uccisi durante la terapia.

Nella tubercolosi polmonare attiva, accanto a pazienti con valori anticorpali bassi, ai limiti della significatività, si possono trovare soggetti in cui le IgG sono presenti a titolo molto elevato. Ma sono descritti anche casi di pazienti con infezione in atto, o in corso di terapia, la cui risposta immune risulta assente; tale anergia potrebbe essere dovuta alla immunodepressione che si accompagna alla infezione tubercolare.

Il monitoraggio in corso di terapia antitubercolare mostra solitamente un aumento significativo del titolo IgG che è spesso indice del buon esito della terapia.

Frequente è il rilevamento contemporaneo di positività IgM ed IgA.

Nella tubercolosi extra-polmonare la sede dell'infezione gioca un ruolo preponderante nella valutazione della risposta immune. Alcune esperienze personali, condotte su un numero rilevante di soggetti affetti da osteomielite tubercolare, hanno evidenziato positività di IgG ed IgA. Per contro pazienti con linfadenite tubercolare, con meningite o con localizzazione pleurica sono risultati positivi con titoli bassi, ai limiti della significatività. Frequente è in questi soggetti la negatività della risposta IgM.

Nelle infezioni post-primarie la positività di IgG è marcata ed il titolo anticorpale rimane costante nel tempo: la negativizzazione varia in relazione allo stato clinico e alla risposta alla terapia. Le IgM sono spesso assenti, mentre le IgA possono essere rilevabili anche a titolo elevato.

Nei soggetti sani tubercolino-negativi non si riscontrano anticorpi circolanti, mentre le IgG sono presenti, in una percentuale generalmente inferiore al 10%, nei tubercolino-positivi e in soggetti a rischio (tecnici di laboratorio di microbiologia, pneumologi, personale infermieristico, personale a frequente contatto con il pubblico, tossicodipendenti).

Le IgG rappresentano quindi un marcatore importante dell'infezione nella tubercolosi attiva, nel monitoraggio della risposta alla terapia tubercolare e nel follow up dei casi pregressi.

Solo recentemente l'interesse dei ricercatori si è rivolto alla valutazione della risposta IgA, soprattutto per verificare se, come in altre patologie infettive, questa classe di immunoglobuline possa assumere significato di indice di fase acuta.

Le IgA compaiono successivamente alle IgM e la permanenza in circolo è assai variabile, il loro elevato riscontro nel siero dopo la guarigione clinica, rilevabile in circa il 25% dei pazienti, non permette di considerarle come marcatori di infezione acuta. Nella tubercolosi polmonare in fase acuta le IgA sono presenti nel 50% dei casi. Analoghe percentuali di positività si riscontrano nelle forme extra-polmonari con titoli particolarmente elevati nelle osteomieliti tubercolari.

La positività contemporanea di IgG ed IgA nelle forme post-primarie potrebbe corrispondere ad una riattivazione.

Nella popolazione sana, tubercolino-negativa, non vi è riscontro di IgA anti-micobatteriche; valori vicini al cut-off si possono rilevare, sia pur raramente, solo in soggetti esposti a rischio infettivo specifico.

Nel suo insieme la valutazione del quadro immuno-sierologico può costituire un elemento aggiuntivo di grande importanza in quei casi in cui gli aspetti clinici, i quadri radiologici, il prelievo di materiale per la coltura siano problematici. La positività per IgG può raggiungere il 75-80%, per le IgM il 32% e per le IgA il 48%, la ricerca contemporanea delle tre immunoglobuline può pertanto elevare la predittività della risposta.

## 8.3 I KIT PER LA SIEROLOGIA DELLA TUBERCOLOSI

### **Principio:**

Il principio alla base di tutti i test sierologici per la tubercolosi è la dimostrazione di un livello significativo di anticorpi circolanti, per lo più di classe IgG, ma anche di classe IgM ed IgA, verso uno o più antigeni di *Mycobacterium tuberculosis*.

L'elemento qualificante di ogni test commercialmente disponibile (l'impiego di reagenti fatti in casa è generalmente limitato ai laboratori di ricerca) è l'antigene, o gli antigeni, impiegato. Esso influisce sulla specificità mentre la tecnologia influisce sulla sensibilità.

La metodica più comunemente impiegata è la enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), di cui possono variare i tempi e le temperature di incubazione. Si consiglia di specificare nel referto il tipo di antigene impiegato riportando anche le percentuali di sensibilità e specificità globali del test.

### **8.3.1. Antigene A60**

È un antigene complesso, macromolecolare e termostabile, estratto dalla tubercolina di riferimento RT-23.

Si tratta pertanto una miscela di numerosi antigeni, variamente miscelati, caratterizzata da reattività con l'intero genere *Mycobacterium*

Ha componenti comuni con altri generi batterici (*Corynebacterium*, *Nocardia*) e protozoi (*Leishmania*).

La specificità è compresa, a seconda degli autori, fra il 75 ed il 90%; la sensibilità varia fra 70 e 80 %.

I test sierologici basati sul A60 hanno il merito di avere riportato la sierologia della tubercolosi fra i test di laboratorio attuali.

I test, si tratta di ELISA (TB-Test, Eurospital), impiegano siero diluito 1:100 ed incubazioni a 37°C; essi consentono la determinazione di IgG, IgM ed IgA (tre kit distinti). Con i kit per IgG ed IgA sono forniti, oltre ai controlli positivo e negativo, cinque sieri titolati per la costruzione di una curva di taratura che permette la conversione del risultato in siero-unità, minimizzando le variazioni in caso di ripetizione e facilitando l'interpretazione dei risultati.

Per il kit IgM è indispensabile, in caso di positività, ripetere la prova pretrattando il siero in esame per rimuovere le IgG.

La letteratura relativa al test è assai ampia, superiore a quella di qualsiasi altro test analogo, e documenta, fra l'altro, le seguenti percentuali di false positività nel corso di altre patologie: leishmaniosi 60%, nocardiosi 100%, sifilide 10%, legionellosi 33%, sarcoidosi 23%, neoplasie polmonari 15%, fibrosi cistica 45%, echinococcosi 30%, la cui conoscenza è indispensabile per una corretta interpretazione dei risultati.

L'antigene A60 viene impiegato anche per un monotest in immunocromatografia in fase solida (Hexagon TB, Humatech), destinato allo screening; la soglia di positività del test è abbastanza alta per IgG ed IgA, più bassa per le IgM; la positività è determinata da tutte le classi anticorpali.

### **8.3.2 Antigene di 38 kDa (Antigene 5) associato ad antigene da 16 kDa**

L'antigene da 38 kDa è un antigene proteico, specifico per il *Mycobacterium tuberculosis* complex; la sensibilità è però massima per il *Mycobacterium tuberculosis*, dato che in esso gli epitopi antigenici hanno una espressione dieci volte maggiore che in *Mycobacterium bovis*. La sensibilità è relativamente bassa (30- 53% a seconda degli autori con un picco del 80% in un lavoro su pazienti indiani), la specificità è buona (91-99%).

L'antigene da 16 kDa, che ha caratteristiche simili, dà una risposta migliore all'inizio della malattia e la sua aggiunta, secondo le prime esperienze, migliora la sensibilità del 5-13%.

Il kit (Pathozyme TB complex Plus, Biogenetics) impiega siero diluito 1:50 e incubazioni a 37°C. La positività si determina in base ad un cut-off che si calcola dividendo per 1.5 la densità ottica del siero debolmente positivo (presente nel kit assieme ai controlli negativo e positivo).

### 8.3.3 Antigene di 38 kDa associato a lipoarabinomannano

Si tratta di un kit (Pathozyme Myco IgG, Biogenetics), destinato allo *screening*, costituito da una miscela dell'antigene di 38 kDa e di un estratto della parete micobatterica, il cui componente principale è il lipoarabinomannano.

Si usa siero diluito 1:100; la procedura è la stessa impiegata per il test basato sul solo antigene da 38 kDa rispetto al quale il test è meno specifico ma nettamente più sensibile.

Esistono kit per la ricerca di IgG, IgA ed IgM; mentre i primi due possono essere impiegati sia per indagini qualitative che quantitative, il terzo è esclusivamente qualitativo.

### 8.3.4 Lipoarabinomannano (LAM)

Il LAM è un costituente lipopolisaccaridico della parete micobatterica che evoca una buona risposta immunitaria.

E' stato ritrovato in circolo, come immunocomplesso, della maggior parte di soggetti malati; ciò ne spiegherebbe, almeno in parte, la relativamente bassa sensibilità sperimentale, dato che, in tal situazione gli anticorpi risultano indisponibili per la rilevazione *in vitro*.

Si tratta di un immunoblotting (Mycodot, AlfaBiotech) che spicca per semplicità e rapidità di esecuzione.

Si può eseguire il test sia su siero che su sangue intero eparinato. La diluizione del siero è di 1:20, ed il test si svolge a temperatura ambiente. L'antigene è situato, in cerchi di 3 mm di diametro, sull'estremità degli otto denti di un pettine di plastica (utilizzabile anche in parte) che si adatta agli 8 pozzetti di una micropiastra. Nella piastra, accanto agli otto pozzetti contenenti i sieri in esame ed i controlli negativo e positivo, si trova una seconda fila di pozzetti contenenti un liquido rivelatore; il pettine viene immerso nella prima fila per 6 minuti, sciacquato in una soluzione di lavaggio, immerso nel liquido rivelatore per 10 minuti, nuovamente sciacquato e in fine letto confrontando l'intensità di colore con le otto gradazioni presenti su un cartoncino.

In una indagine multicentrica eseguita in Italia nel 1996 su 1105 soggetti, fra malati e controlli, si sono rilevati valori di sensibilità del 46% e di specificità del 95%.

### 8.3.5 Antigene kP 90 (ImCRAC)

E' un test in ELISA (TB IgA EIA, Prodotti Gianni), che rileva anticorpi della sola classe IgA che, per tale antigene, sono stati dimostrati non essere presenti nei soggetti sani.

Si impiega siero diluito 1:400, e le incubazioni sono a 37°C.

Nel kit sono compresi un controllo negativo, uno positivo ed un calibratore il cui risultato costituisce il cut-off: valori superiori ad 1,15 del cut-off sono considerati positivi, valori inferiori ad 0,85 sono negativi mentre il risultato è dubbio per valori intermedi.

In uno studio italiano nel 1997 su 262 soggetti, fra malati e controlli, si sono rilevati valori di sensibilità di circa il 70%, con una specificità di circa il 92%.

Fra le possibili cause di false positività sono segnalati in letteratura diabete mellito, pregresse malattie cerebro- e cardio-vascolari, neoplasie, artrite reumatoide e malattie autoimmuni.

### 8.3.6 Cocktail di 5 peptidi sintetici e proteine ricombinanti

Gli antigeni impiegati non sono resi noti dalla ditta produttrice.

Si tratta di un test (Detect-TB, BioChem-ImmunoSystems) in ELISA che impiega siero diluito 1:20 e incubazioni a temperatura ambiente.

Il cut-off si ottiene aggiungendo 0,150 alla media delle densità ottiche di tre determinazioni su un apposito siero negativo.

Viene anche fornito un siero positivo, da saggiare in doppio, la cui densità ottica non deve essere, pena la non validità del test, inferiore ad un valore prestabilito.

Uno studio condotto in Italia nel 1996 su 543 soggetti, fra malati e controlli, ha evidenziato una sensibilità globale del 75%, ed una specificità globale del 97%.

Più analiticamente: la sensibilità nei soggetti positivi all'esame microscopico è risultata pari al 84%, in quelli negativi del 64%; e la specificità, nei soggetti PPD-negativi, del 99%, in quelli PPD-positivi del 92%, nei vaccinati con BCG del 100%, nei soggetti esposti ad *Mycobacterium tuberculosis* del 98%, nei pazienti con malattie polmonari non tubercolari del 85%.

Nei pazienti tubercolari trattati e guariti il test può restare positivo per molti anni.

Essendo il test di recentissima commercializzazione, la letteratura è scarsa.

**Materiali occorrenti:**

I kit commerciali contengono tutto il necessario per l'esecuzione del test; per quelli in ELISA, ovviamente, è richiesta l'attrezzatura abituale di questa diffusa e collaudata tecnica; per alcuni di essi è consentita la lettura non strumentale.

**Controllo di qualità:**

Ogni kit ha almeno un controllo positivo ed uno negativo.

E' consigliabile, per la valutazione della ripetibilità del test, l'inserimento in ciascuna seduta di un siero negativo e di un siero positivo propri, da aliquotare e congelare a -20°C (o meglio a -80°C).

Non possono essere usati sieri conservati con azide.

## BIBLIOGRAFIA

- Alifano M., De Pascalis R., Sofia M., Faraone S., Del Pezzo M., Covelli I. Evaluation of IgA-mediated humoral immune response against the mycobacterial antigen P-90 in diagnosis of pulmonary tuberculosis. 1997. Chest. 111:601-605.
- Alifano M., Del Pezzo M., Lamberti C., Faraone S., Covelli I. ELISA method for evaluation of anti-A60 IgG in patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. 1994. Microbiologica. 17:37-44.
- Benjamin R.G., Daniel T.M. Serodiagnosis of tuberculosis using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. 1982. Am. Rev. Respir. Dis. 126:1013-16.
- Charpin D., Herbault H., Gevaudan M.J. Saadjian M., De Micco P.H., Arnaud A., Vervloet D., Charpin J. Value of ELISA using A60 antigen in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. 1990. Am. Rev. Respir. Dis. 142:380-84.
- Cocito C. Properties of the mycobacterial antigen complex A60 and its application to the diagnosis and prognosis of tuberculosis. 1991. Chest. 100:1687-1693.
- Cuboni A., Mandler F., Marchesani F., Patanè E. Comparative evaluation between two glycolipidic antigens (PGL-Tb1 and DAT), lipoarabinomannan and a kDa38 antigen of *M. tuberculosis*, for the serological diagnosis of tuberculosis. 1994. 15th Annual Meeting of ESM. Athens. 10.
- Marchetti D., Favero A., Gasponi A., Cimmino C., Maietta M.A. La risposta umorale IgA nella malattia tubercolare. 1995. Microbiologia Medica. 10:297-299.

## 9 REFERTAZIONE

M. Liguori

Per evitare ritardi sia nell'inizio della terapia sia nelle procedure di controllo del contagio, è opportuno che, in caso di positività dell'esame microscopico e/o colturale, l'invio del referto scritto sia preceduto dalla tempestiva comunicazione telefonica o via fax al richiedente (medico o direttamente al paziente nel caso di esami eseguiti ambulatorialmente).

Tale procedura potrà essere adottata anche in seguito per i risultati dell'identificazione e dell'antibiogramma.

Sarebbe inoltre utile annotare su apposito registro data, ora e nominativi del personale con cui la comunicazione è intercorsa.

Per quanto riguarda il referto, in esso andranno indicati i dati identificativi del paziente, il tipo di campione, la data in cui è pervenuto, il reparto di provenienza nonché eventuali annotazioni sulla non idoneità di prelievo o di trasporto del campione.

Per quanto riguarda l'esame microscopico dovranno essere refertate esclusivamente la presenza, o l'assenza, di bacilli alcol-acido resistenti, o di micobatteri, in nessun caso dovrà farsi riferimento al *Mycobacterium tuberculosis*.

In caso di positività dovranno essere fornite indicazioni sulla carica batterica mediante un indice numerico di positività (1+, 2+, 3+ e 4+) meglio se seguito da una chiave di interpretazione.

E' buona norma precisare se l'esame colturale è in corso di esecuzione e, in tal caso, la data in cui il referto finale si renderà disponibile.

Per quanto riguarda l'esame colturale potranno essere indicate le metodiche utilizzate, in particolare: tradizionale, radiometrica o entrambe, anche in considerazione dei differenti costi previsti per ognuna di esse dal tariffario attualmente in vigore.

In caso di crescita in coltura potrà essere refertato in via preliminare: "Coltura positiva per micobatteri, identificazione in corso".

Di fondamentale importanza è la segnalazione delle colture contaminate per dar la possibilità al clinico di provvedere sollecitamente all'invio di un nuovo campione.

Appena possibile verrà comunicato se l'organismo isolato appartiene al *Mycobacterium tuberculosis* complex o è un micobatterio non tubercolare, facendo seguire successivamente l'identificazione di specie appena disponibile.

Nel referto dell'antibiogramma dovranno essere elencati i farmaci testati con l'indicazione di sensibilità o resistenza.

Sia per l'identificazione che per il test di sensibilità ai farmaci, potrà essere riportata la metodica utilizzata, essendo contemplate tariffe differenziate per alcune di esse.

Secondo i suggerimenti dei Centers for Disease Control and Prevention, fra gli obiettivi che il laboratorio di micobatteriologia dovrebbe proporsi figurano i seguenti tempi di refertazione:

- esame microscopico, entro 24 h dal ricevimento del campione;
- identificazione entro 10-14 giorni dall'isolamento;
- saggio di sensibilità ai farmaci entro 15-30 giorni.

Sebbene nella legislazione attuale non figuri fra i doveri del laboratorista la notifica dei casi di tubercolosi all'autorità sanitaria competente, in alcune regioni italiane si è stabilito un rapporto di collaborazione, fra i Laboratori di microbiologia ed i Servizi di igiene pubblica, per il controllo incrociato delle denunce che il clinico è tenuto a inoltrare.

In tali casi è consigliabile che il laboratorista invii al servizio di igiene copia del referto finale, cioè di quello in cui risulta l'identificazione come *Mycobacterium tuberculosis* (o come appartenente al *Mycobacterium tuberculosis* complex) del micobatterio isolato.

## BIBLIOGRAFIA

- McClenny N. Reporting mycobacterium test results. 1991. In: Isenberg H.D. (ed.) Clinical microbiology procedures handbook. 3.16.1-3.16.4. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburgh C.R. Jr; Good R.C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? 1993. J. Clin. Microbiol. 31:767-770.

## 10 ORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI MICOBATTERIOLOGIA

Claudio Scarparo

La tubercolosi è attualmente, nel mondo, la prima causa di morte da singolo agente infettivo, causando ogni anno circa 3 milioni di morti, ed il suo *trend* sembra essere in continuo aumento. Inoltre anche in Italia, che può essere considerato un paese a bassa endemia, i micobatteri, in questi ultimi anni, hanno nuovamente assunto un ruolo importante come causa di malattia diventando uno dei principali problemi di sanità pubblica.

I laboratori di micobatteriologia svolgono un ruolo fondamentale nella diagnostica delle infezioni da micobatteri e concorrono direttamente al controllo della tubercolosi, il cui incremento obbliga oggi a sviluppare delle strategie in grado di ridurre la morbilità e la mortalità.

I principali organismi internazionali ritengono necessaria, per i paesi a bassa incidenza di tubercolosi, la centralizzazione delle procedure diagnostiche in pochi laboratori, per i quali è prevista un'attività minima di 20 campioni alla settimana. La qualità delle prestazioni è infatti legata all'esperienza professionale degli operatori, esperienza che si acquisisce e si mantiene con la continua attività su un adeguato numero di campioni.

Questi limiti sono ben al di sopra di quanto ipotizzabile nella maggior parte dei laboratori italiani e sarebbe opportuno ed auspicabile, in Italia, un censimento dei laboratori che svolgono indagini diagnostiche sulle infezioni da micobatteri, per avere dei dati attendibili che permettano di fotografare la situazione reale.

E' necessario ed obbligatorio, inoltre, che i laboratori assicurino un elevato livello di sicurezza per gli operatori, adeguando le strutture, le attrezzature e le condizioni di lavoro, a quanto previsto dal Decreto Legge 626/94.

In accordo con le raccomandazioni della letteratura internazionale, viene proposta anche per l'Italia una rete di laboratori articolata su tre livelli, adattabile tuttavia alle esigenze locali..

E' necessario sottolineare che nel nostro paese l'organizzazione dei laboratori è demandata alle Regioni e agli Enti Regionali preposti. Sebbene attualmente solo la Regione Veneto abbia approvato, con delibera regionale, delle linee guida per l'organizzazione dei laboratori di micobatteriologia, è auspicabile che l'esempio venga seguito quanto prima da altri.

### **Laboratorio di 1° livello diagnostico**

#### **Compiti:**

- Raccolta, verifica dell'adeguatezza e accettazione dei campioni biologici.
- Spedizione o trasporto a laboratori di livello superiore.
- Eventuale esecuzione dell'esame microscopico (diagnosi rapida o monitoraggio della terapia), che dovrà essere ripetuto dal laboratorio di livello superiore.

#### **Requisiti:**

- Rispetto delle indicazioni di legge per la gestione e l'invio del materiale biologico ai laboratori di livello superiore (Circolare Ministero della Sanità n° 16 del 20.07.94. prot. 400.2/113.2/82/3193).
- Per l'esecuzione dell'esame microscopico vi deve essere la disponibilità di una cappa di sicurezza biologica (a flusso laminare biohazard classe II).

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Attivazione di un controllo di qualità interno conservando la documentazione per un anno.
- Partecipazione al Sistema di Sorveglianza Regionale della tubercolosi.

### **Laboratorio di 2° livello diagnostico**

#### **Compiti:**

- Esecuzione dell'esame microscopico, preferibilmente usando la colorazione con i fluorocromi, dopo concentrazione del campione, e segnalazione dei risultati entro 24 ore lavorative.
- Esecuzione dell'esame colturale in terreno liquido e su terreno solido.
- Identificazione del *Mycobacterium tuberculosis* ed eventualmente dei micobatteri non tubercolari di più frequente isolamento o invio dei ceppi al laboratorio di livello superiore.
- Eventuale esecuzione dei test di sensibilità per *Mycobacterium tuberculosis* in terreno liquido con farmaci di prima scelta.
- Eventuale identificazione diretta da materiale biologico del *Mycobacterium tuberculosis*.
- Conservazione per almeno due anni dei ceppi isolati e/o invio al laboratorio di livello superiore.
- Collaborazione ad iniziative regionali di addestramento del personale.
- Spedizione o trasporto dei campioni positivi o sospetti a laboratori di livello superiore per ulteriori indagini, con rispetto delle indicazioni di Legge.

#### **Requisiti:**

- Disponibilità di uno spazio riservato alla diagnostica dei micobatteri.
- Disponibilità di una cappa a flusso laminare biohazard classe II.
- Disponibilità di centrifuga refrigerata con protezione da rischio biologico.
- Processazione di almeno 20 campioni alla settimana.
- Attivazione delle Buone Pratiche di Laboratorio ed esecuzione di un controllo di qualità interno, conservando la documentazione per almeno un anno.
- Partecipazione a programmi di aggiornamento e formazione del personale.
- Partecipazione obbligatoria ad una valutazione esterna di qualità per i micobatteri e conservazione della documentazione per almeno 3 anni.
- Partecipazione al Sistema di Sorveglianza Regionale della tubercolosi.

### **Laboratorio regionale di riferimento (3° livello diagnostico)**

#### **Compiti:**

- Attività dei livelli precedenti.
- Identificazione dei micobatteri non tubercolari e delle specie del *Mycobacterium tuberculosis* complex.

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

- Identificazione rapida, direttamente da materiale biologico, del *Mycobacterium tuberculosis* complex.
- Esecuzione dei test di sensibilità in terreno liquido ai farmaci di prima scelta per *Mycobacterium tuberculosis* e, in presenza di resistenze, anche ai farmaci di seconda scelta.
- Esecuzione, quando clinicamente utile, di test di sensibilità per micobatteri non tubercolari.
- Utilizzo non solo delle tecniche più collaudate ed economiche, ma anche di quelle tecnologicamente più avanzate e costose.
- Sorveglianza a scopo epidemiologico della circolazione dei ceppi micobatterici, anche a supporto di indagini su eventuali emergenze epidemiche.
- Raccolta ed aggiornamento periodico dei ceppi micobatterici di maggiore interesse epidemiologico e organizzazione della loro conservazione.
- Sorveglianza delle farmacoresistenze.
- Attività di aggiornamento e formazione permanente del personale deputato alla diagnostica delle micobatteriosi.
- Partecipazione a programmi nazionali ed internazionali di aggiornamento e formazione permanente del personale.

## BIBLIOGRAFIA

- Cernoch P.L., Enns R.K., Saubolle M.A., Wallace R.J.Jr. Cumitech 16A. Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. 1994. Coordinating ed. Weissfeld A.S.. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Chiaradonna P., Girardi E., Spanò A., Tronci M.. Risultati dell'indagine conoscitiva nazionale sulla diagnostica delle infezioni da micobatteri negli ospedali sede di reparto di malattie infettive. 1996. Microbiologia Medica. Suppl 11:59-62.
- Delibera della Giunta Regionale del Veneto n. 2824 del 05.08. 1997.
- Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburgh C.R.Jr., Good R.C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? 1993. J. Clin. Microbiol. 31:767-770.

## INDICE ANALITICO

### A

Accuprobe · 58  
Acido p-acetico · 13  
Aerosol · 7  
Aggiornamento e formazione · 105  
Alcol-acido resistenza · 20; 29; 44  
Alcool isopropilico · 9; 10  
AmpErase · 89  
Amplicor · 89; 92  
Amplificazione · 83; 92  
Antigene 38 kDa · 98; 99  
Antigene 5 · 98  
Antigene A60 · 98  
Antigene kP 90 · 99  
Arilsolfatasi · 47  
Aspirato gastrico · 15; 16; 18  
Aspirato transtracheale · 15  
Associazioni di farmaci · 79  
Auramina (colorazione) · 22  
Autoclave · 12

### B

Bactec 12B · 34; 62  
Bactec 13A · 42  
Bactec 460TB · 34; 55; 69; 71; 73; 78  
Bactec 9000/F MB · 37  
Bactec MGIT 960 · 37  
Bactec PZA drug kit · 72  
Bactec S.I.R.E. · 70  
Beta-glucosidasi · 47  
Bioptici (prelievi) · 15; 16; 17  
Broncoaspirato · 15, 16

### C

Campioni biologici · 14  
Cappa a flusso laminare · 10; 12; 103; 104  
Capreomicina · 62  
Catalasi · 48; 49  
Catalasi semiquantitativa · 48  
Cloroderivati · 9  
Cobas Amplicor · 89  
Coletsos medium · 28  
Colonie (morfologia) · 44; 49  
Concentrazioni assolute (antibiogramma) · 61  
Conservazione dei ceppi · 114; 105  
Contaminazioni · 23  
Contaminazioni (amplificazione) · 83; 86; 88; 89  
Controllo di qualità · 23; 26; 29; 31; 32; 35; 37; 38; 39; 40; 47; 48; 49; 51; 52; 53; 54; 55; 57; 60; 65; 68; 72; 73; 75; 82; 86; 89; 92; 100; 104

### D

Decontaminazione · 17; 18; 25; 69  
Derivatizzazione · 56  
Diretto (antibiogramma) · 69  
Disinfettanti · 9; 13  
Disinfezione · 12  
DNA-probe · 59  
Droplet nuclei · 6

### E

ELISA · 98; 99; 100

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

Emocoltura · 40; 42; 60

Epidemiologia · 105

Esame colturale · 25; 101; 104

Esame microscopico · 20; 101; 103; 104

ESP Culture System II · 38

ESP Myco · 38

Espettorato · 14

Espettorato indotto · 15

Etionamide · 62; 63

### F

Farmaci antitubercolari · 61; 62; 66

Farmacoresistenze · 105

Fattore reumatoide · 96; 99

Feci · 15; 16

Fenolo · 10; 20

Filtrazione · 12

Formaldeide · 9; 13

### G

Glutaraldeide · 9; 13

Gottsacker (medium) · 28

Growth index · 34; 40; 55; 73

Gruft (medium) · 28

### H

H37Rv · 65; 68; 72; 73; 89

HPLC · 56

Hybridization protection assay · 84

### I

Identificazione · 44; 47; 55; 56; 59

Idrazide dell'acido tiofen-carbossilico · 50

Idrolisi del Tween · 53

Idrossilamina · 50

IgA · 96; 97

IgG · 96; 97

IgM · 96; 97

Incenerimento · 12

Incidenti di laboratorio · 10

Inibitori · 87; 89; 92; 93

Inibizione selettiva · 50

Iodofori · 9

Isolator · 15; 17; 42

Isoniazide · 10; 50; 62; 66

IUTM medium · 28

### K

Kanamicina · 62; 63

Kinyoun (colorazione) · 21

Kirchner ·(medium) 32

### L

Lavaggio bronco-alveolare · 15; 16

LCR · 84; 87

LCx · 87; 92

Lesioni cutanee · 15; 17

Ligase Chain Reaction · 84; 87

Lipoarabinomannano · 99

Liquidi cavitari · 15; 16; 18

Liquor · 15; 16

Livelli di contenimento · 7

Livelli diagnostici · 103; 104

Lowenstein-Jensen · 28

Lowenstein-Jensen (antibiogramma) · 63

Lowenstein-Jensen 5%NaCl · 50

## M

MAC · 77  
MacConkey · 50  
Maschera · 10; 11; 69  
MB Redox · 32  
MB/BacT · 36  
MB/BacT Blood Culture Bottle · 42  
MEIA · 87  
Metodo delle proporzioni (antibiogramma) · 61; 63; 69  
MGIT · 3; 37; 74  
MGIT (antibiogramma) · 74  
MGIT AST SIRE · 74  
MIC · 77; 79  
Micobatteri a lenta crescita (antibiogramma) · 76  
Micolici (acidi) · 20; 56  
Middlebrook 7H10 · 28; 49  
Middlebrook 7H10 (antibiogramma) · 62; 66  
Middlebrook 7H11 · 28; 31; 62  
Midollo osseo · 15; 17  
Mitchison (medium) · 28  
MOTT · 44; 47; 55  
MTD · 84; 92  
*Mycobacterium avium* complex · 77  
*Mycobacterium tuberculosis* · 6; 52  
*Mycobacterium tuberculosis* complex · 61  
*Mycobacterium xenopi* · 50

## N

NALC-NaOH · 25; 26; 85; 88  
NAP-test · 47; 55  
NASBA · 84

Niacina · 51  
Nitrati (riduzione) · 52  
Notifica (casi di TB) · 101

## O

OADC · 30; 66  
Organizzazione dei laboratori · 103  
Ossido di etilene · 13

## P

PACT · 28  
PANTA · 30; 34; 37; 38  
PAS · 62  
PCR · 83; 89  
PCR in house · 88  
Performance Test Kit · 35; 40  
Perossido di idrogeno · 9; 13  
Petraghani (medium) · 28  
Pigmento · 50  
Pirazinamide · 62; 72; 73  
Polymerase chain reaction · 83; 89  
Pressione negativa · 7; 11  
Primer · 83; 89  
Pus · 15; 16  
PZA Test medium · 72

## R

Radiazioni ionizzanti · 12  
Radiazioni ultraviolette · 12  
Radiometria · 34; 40; 55  
Radiometria (antibiogramma) · 69; 72  
Refertazione · 23; 101  
Resistance-ratio (antibiogramma) · 61  
Ricambi di aria · 11

## AMCLI quaderni di microbiologia clinica

Rischio occupazionale · 6; 8; 10

### S

Sangue · 15; 17

SDA · 84

Semina · 25

Sensibilità agli antibiotici (test) · 61; 69; 72;  
74; 77; 78; 79

Sensibilità (metodo diretto) · 69

Septi-Chek · 31

Sierologia · 95

Sistema di sorveglianza della tubercolosi ·  
104

Sistemi automatici · 36

Sorveglianza sanitaria · 10

Spazzolatura bronchiale · 15; 16

Sterilizzazione · 12

Striscio microscopico · 20

### T

Tampone (prelievo) · 18

TB hydrolysis reagent · 53

TB niacin test strips · 51

Tellurito (riduzione) · 52

Temperature di crescita · 49

Termoinattivazione catalasica · 49

Terreni liquidi · 30

Terreni selettivi · 28

Tiacetazone · 50

TMA · 83

Transcription Mediated Amplification · 83

### U

Urea broth · 53

Ureasi · 53

Urine · 15; 16; 18

### V

Vaccinazione · 10

Velocità di crescita · 50

### Z

Ziehl-Neelsen (colorazione) · 21

Si ringrazia la Becton Dickinson Italia SpA per il supporto alla pubblicazione del presente manuale