

# MANUALE TECNICO PER LA DIAGNOSI MICROBIOLOGICA DELLA TUBERCOLOSI

## **INDICE**

PREFAZIONE

PARTE GENERALE INTRODUTTIVA

PARTE TECNICA

1. Raccolta dei campioni per la ricerca dei micobatteri
2. Fluidificazione e decontaminazione dei campioni
3. Esame microscopico
4. Identificazione di *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente dai campioni clinici
5. Esame colturale
6. Emocoltura
7. Identificazione
8. Test di sensibilità ai farmaci
9. La sicurezza nel laboratorio di micobatteriologia

BIBLIOGRAFIA

## PREFAZIONE

Questo documento si propone di orientare le attività e gli interventi di sanità pubblica nel settore della diagnostica di laboratorio della tubercolosi. Esso si compone di una introduzione generale alle problematiche diagnostiche e di una parte tecnica. Esso è stato elaborato dal gruppo di lavoro sulla tubercolosi istituito con apposito Decreto del Ministero della Salute il 5 luglio 2001. Il documento è diretto ai microbiologi, ai laboratoristi, ai clinici, agli operatori di sanità pubblica, ed al personale tutto comunque interessato e coinvolto nel controllo della malattia tubercolare in Italia.

## PARTE GENERALE INTRODUTTIVA

### ***Generalità e natura dell'agente eziologico e della malattia tubercolare***

La tubercolosi nelle sue varie forme (polmonari ed extra-polmonari) è causata da un gruppo di micobatteri collettivamente denominati *Mycobacterium tuberculosis* complex costituito da *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium bovis*. *Mycobacterium tuberculosis* è il responsabile quasi esclusivo della malattia tubercolare nel nostro paese. Si tratta di un batterio di forma bastoncellare, Gram-positivo, acido-resistente, ricco in lipidi ed a lenta crescita.

L'uomo si infetta attraverso l'inalazione di batteri vivi e virulenti contenuti in goccioline di saliva (droplet nuclei) emessi attraverso tosse, starnuto, canto o fonazione, da soggetti affetti da tubercolosi polmonare contagiosa. Le forme extrapolmonari di tubercolosi non sono contagiose.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità stima in circa un terzo della popolazione mondiale il numero di persone infettate da *Mycobacterium tuberculosis*. Il soggetto infettato da *Mycobacterium tuberculosis* mostra una reazione di ipersensibilità ritardata agli antigeni micobatterici, evidenziata solitamente da cutipositività al test di Mantoux. I soggetti infetti hanno una probabilità di circa il 10% di ammalarsi di tubercolosi nel corso della vita, ma questa probabilità aumenta in presenza di fattori di rischio quali, soprattutto, l'infezione da HIV.

*Mycobacterium tuberculosis* è in genere suscettibile ad un certo numero di chemioterapici. Isoniazide, rifampicina, pirazinamide, streptomina, etambutolo sono considerati i farmaci di prima scelta nella terapia della tubercolosi, pertanto, la malattia tubercolare è curabile con una combinazione di questi ed altri farmaci, e, se il trattamento terapeutico è correttamente eseguito, la mortalità per tubercolosi è trascurabile. La prevenzione si basa essenzialmente sull'identificazione e l'isolamento dei casi contagiosi, sul trattamento farmacologico con isoniazide od altri farmaci dei soggetti con infezione latente, impedendo così il passaggio a malattia tubercolare attiva, e sulla vaccinazione dei soggetti ad elevato rischio di contagio con il BCG, efficace per alcune forme tubercolari dei bambini, di dubbia efficacia nell'adulto.

### ***Cenni generali sulla diagnostica di laboratorio***

*Il laboratorio di micobatteriologia clinica ed il suo ruolo nel controllo della malattia tubercolare.*

La definizione e promozione di percorsi diagnostici in grado di assicurare una diagnosi di laboratorio tempestiva e corretta riveste un ruolo fondamentale per il controllo della tubercolosi. Tale diagnosi viene posta dai laboratori di micobatteriologia clinica che svolgono quindi un ruolo centrale nella lotta alla malattia. Il loro contributo consiste essenzialmente nella ricerca e nell'isolamento dei micobatteri, nella loro identificazione a livello di specie, nonché nella determinazione della sensibilità del ceppo isolato ai chemioterapici.

Poiché la diagnosi microbiologica di tubercolosi richiede in genere metodi e reagenti specifici di uso non routinario, nonché più tempo e maggiori requisiti di biosicurezza rispetto alla comune diagnostica batteriologica, soltanto i laboratori di microbiologia clinica con sufficiente volume di esami microbiologici possono mantenere nel tempo un'adeguata competenza nella diagnosi micobatteriologica. Questo è particolarmente importante in un paese come l'Italia a bassa incidenza di malattia tubercolare (<10 casi/100.000 abitanti).

Date queste caratteristiche, nonché la necessità di:

1. assicurare la persistenza delle competenze acquisite ed il loro miglioramento a fronte dell'introduzione di nuove metodologie diagnostiche;
2. garantire prestazioni in condizioni di biosicurezza per gli operatori secondo le vigenti norme;
3. organizzare la raccolta degli isolati micobatterici ed eventualmente tipizzarli, nonché distribuire detti ceppi per studi specifici, inclusi i controlli di qualità;

è essenziale definire una rete di laboratori di micobatteriologia clinica che eviti dispersione diagnostica in laboratori senza le necessarie competenze ed inconsistenti livelli di attività e favorisca invece livelli differenziati ma inclusivi di

responsabilità diagnostica, attività e struttura di biosicurezza. Nei paesi industrializzati e a bassa endemia tubercolare la diagnostica microbiologica della tubercolosi prevede una organizzazione dei laboratori in livelli che ha consentito di arrivare ad un significativo miglioramento della qualità e dell'efficienza.

#### Il livello 1.

La sua attività consiste nell'eseguire un esame microscopico per la presenza di batteri acido-resistenti. L'esame batterioscopico richiede un controllo di qualità interno, ed una procedura operativa standard. Questo laboratorio riferisce il campione al livello superiore per l'esame colturale (isolamento ed identificazione). Non esegue saggi molecolari. Non ha bisogno di particolari attrezzature di sicurezza ma è comunque raccomandabile possieda una cappa biologica di classe II.

#### Il livello 2.

La sua attività consiste nell'eseguire sia l'esame microscopico che quello colturale, nonché test standardizzati di diagnostica molecolare. Esso è pertanto in grado di identificare *Mycobacterium tuberculosis* complex. E' anche in grado di eseguire i test di sensibilità ai farmaci antitubercolari di prima linea. Riceve campioni dal laboratorio di livello 1 ed il bacino di utenza è di circa un milione di abitanti. La sezione di micobatteriologia è separata dal resto del laboratorio microbiologico da una zona neutra dove non si processano campioni biologici (anticamera). Ha un programma di formazione ed aggiornamento periodico degli operatori e partecipa ai controlli di qualità esterna. Il livello 2 si qualifica come tale se esegue un certo numero di esami colturali ogni mese tale da garantire il mantenimento nel tempo del richiesto livello di competenza. Possiede una cappa biologica di sicurezza di classe II ed una centrifuga con protezione anti-aerosol.

#### Il livello 3.

Si tratta di un laboratorio con tutte le prerogative del precedente livello ma con in più la piena expertise di identificazione definitiva di una qualsiasi specie di micobatterio. Esegue i test di sensibilità anche agli agenti antitubercolari di seconda linea ed ha particolare expertise per le diagnosi molecolari. Raccoglie e tipizza ceppi e coordina e gestisce test di proficiency e controlli di qualità a livello regionale o nazionale **con particolare riferimento alla raccolta e tipizzazione di isolati di micobatteri da cluster epidemici**. Partecipa a tests di proficiency internazionali, ha rapporti collaborativi con analoghi laboratori internazionali e coordina/gestisce programmi di formazione ed aggiornamento degli operatori. Le sue attività sono particolarmente indicate in caso di epidemie e per la conoscenza dei quadri epidemiologici della tubercolosi e di altre micobatteriosi sostenute da ceppi antibiotico-resistenti. Funziona da Centro di riferimento regionale/nazionale ed ha un bacino d'utenza di 5-10 milioni di abitanti. Per questo livello è raccomandabile la presenza di un laboratorio di contenimento di biosicurezza di classe terza (P3). Ha un responsabile con adeguato curriculum professionale nel settore della micobatteriologia.

Oltre ai tre livelli sopradescritti, la rete dei laboratori di micobatteriologia clinica si avvale, laddove necessario e richiesto, delle competenze della sezione di Micobatteriologia del Dipartimento di malattie infettive, parassitarie ed immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità, presso la quale esistono tutte le competenze ed i requisiti di biosicurezza, incluso il livello P3, per la diagnostica micobatteriologica, una comprovata esperienza di ricerca scientifica di livello internazionale nel settore della micobatteriologia nonché un Centro Sopranazionale di riferimento, designato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, per la valutazione dei test di sensibilità ai farmaci antimicobatterici. Questa Sezione può svolgere un particolare ruolo in caso di emergenze micobatteriologiche legate ad epidemie da batteri multiresistenti, per i tests di proficiency diagnostica ed i controlli di qualità esterni nonché per l'elaborazione di documenti e procedure operative per i laboratori di riferimento regionali.

### **Procedure diagnostiche**

#### *Raccolta dei campioni.*

I campioni clinici vanno inviati in laboratorio nel più breve tempo possibile (idealmente entro mezz'ora) e comunque entro 24 ore dal prelievo. Per le modalità di prelievo consultare il capitolo 1 del protocollo tecnico allegato.

#### *Esame microscopico.*

La prima tappa nella diagnosi di laboratorio di tubercolosi è costituita dall'esame microscopico. Strisci allestiti dal sedimento di campioni precedentemente decontaminati vengono colorati per la ricerca dei bacilli alcool-acido resistenti (BAAR). Sebbene la sensibilità della microscopia sia relativamente bassa (circa  $5 \times 10^3$  BAAR per ml di

campione), il numero di bacilli tubercolari rilevati all'esame microscopico correla fortemente con il rischio di trasmissione interumana. In condizioni routinarie, il risultato dell'esame microscopico dovrebbe essere disponibile entro 24 ore lavorative dal ricevimento del campione.

#### *Utilità clinica dei test molecolari per l'identificazione di Mycobacterium tuberculosis complex direttamente da campione.*

Esiste ormai un'ampia letteratura sulla diagnostica molecolare di tubercolosi direttamente dal campione biologico che si è arricchita straordinariamente negli ultimi dieci anni, a seguito della introduzione di nuovi saggi. Peraltro, la gran parte dei lavori pubblicati risponde solo in parte a rigorosi criteri universalmente accettati per la valutazione dei test diagnostici in quanto in essi non sono esplicitati il disegno prospettico, i criteri di arruolamento dei pazienti e l'esecuzione in cieco rispetto al test di riferimento. Per la valutazione dell'utilità clinica di questi test, i risultati della letteratura vanno pertanto considerati nel contesto di queste limitazioni metodologiche. L'impiego clinico dei test molecolari può, quindi, essere raccomandato nei laboratori ove siano contestualmente eseguiti gli esami tradizionali per la tipizzazione degli isolati da campioni di espettorato con esame microscopico positivo. Per quanto riguarda i campioni respiratori con esame microscopico negativo, i Centers for Disease Controls (CDC) raccomandano di considerare con molta cautela l'esito di due test Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD) positivi come diagnostici di tubercolosi, nel contesto del sospetto clinico, in quanto ciò in realtà si basa su un solo studio non pubblicato, ancorché disponibile nel sito web dei CDC:

(<http://www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4926a3.htm>) (CDC, MMWR 2000 49: 593-594) in attesa di studi clinici prospettici che ne validino l'uso. La sua applicabilità dovrebbe essere comunque riservata ai Laboratori di 2° e 3° livello, ove esistano adeguati livelli di specializzazione clinica e microbiologica e dove possano essere adottate sia tecniche di indagine clinica avanzate che procedure di laboratorio adeguate.

#### *Esame colturale.*

La diagnosi microbiologica definitiva di tubercolosi si ottiene con l'isolamento in coltura di *Mycobacterium tuberculosis* complex. Per accorciare al massimo i tempi di isolamento ed al fine di ottenere una più rapida identificazione, viene attualmente raccomandata la combinazione di un terreno solido e di un terreno liquido. Quest'ultimo ha rivoluzionato i tempi di coltura consentendo di ridurli da 3-6 settimane a 7-14 giorni. Nonostante ciò, i terreni all'uovo come il Löwenstein-Jensen vanno comunque impiegati poiché consentono la crescita di alcuni ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* complex e di alcune specie non tubercolari che non riescono a svilupparsi negli altri terreni.

#### *Identificazione.*

Una volta isolato in coltura e previa verifica microscopica della alcool-acido resistenza, il microrganismo può essere identificato come *Mycobacterium tuberculosis* complex utilizzando: a) un test radiometrico di inibizione selettiva (NAP test), b) specifici test molecolari (sonde a DNA con o senza amplificazione), c) cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) applicata all'analisi degli acidi micolici di parete da cui si ricava un tracciato specie-specifico, d) i tradizionali test biochimici quali la produzione di niacina e la riduzione dei nitrati che presentano tuttavia il grave limite di non poter essere applicati alle colture in terreno liquido, richiedendo lo sviluppo in terreno solido. Il NAP test può essere completato in 3-5 giorni, mentre per le sonde a DNA e l'analisi HPLC sono sufficienti non più di 2-5 ore. E' necessario ricordare inoltre, che, per la corretta esecuzione delle procedure relative alle sonde a DNA senza amplificazione ed all'HPLC, è indispensabile una biomassa di circa  $10^7$  bacilli. In condizioni ottimali, usando il metodo radiometrico o altri sistemi di coltura liquidi e, combinandoli con uno dei suddetti metodi rapidi, si può arrivare ad identificare *Mycobacterium tuberculosis* complex entro 10-14 giorni dalla ricezione del campione.

#### *Test di sensibilità ai farmaci antitubercolari.*

E' attualmente raccomandato che tutti i nuovi isolati di *Mycobacterium tuberculosis* complex siano saggiati nei confronti dei farmaci antitubercolari di prima scelta quali isoniazide, rifampicina, pirazinamide, etambutolo e streptomina. L'antibiogramma dovrebbe essere ripetuto anche quando le colture continuano ad essere positive dopo tre mesi di terapia. Per abbreviare il tempo di esecuzione del test di sensibilità, viene raccomandato il metodo delle proporzioni eseguito in terreno liquido radiometrico. Esso utilizza singole concentrazioni dei farmaci antitubercolari definite "critiche" e fissa all'1% la proporzione di bacilli resistenti (10% per la pirazinamide) al di sopra della quale il ceppo è considerato resistente. Usando questo sistema, i risultati dell'antibiogramma possono essere trasmessi al clinico entro 21-30 giorni dalla ricezione del campione. Oltre al metodo radiometrico, sono

disponibili altri sistemi liquidi non-radiometrici in grado di eseguire il test di sensibilità per *Mycobacterium tuberculosis* complex (ESP Culture System II; BacT/Alert MB; MGIT 960). Fra essi, solo il sistema ESP II è validato dalla U.S. Food and Drug Administration per i farmaci antitubercolari primari esclusa la pirazinamide.

### **Biosicurezza**

#### *Spedizione dei campioni*

Per quanto attiene alla spedizione di campioni biologici potenzialmente contenenti *Mycobacterium tuberculosis*, esistono requisiti generali per la spedizione di sostanze infette, campioni biologici e diagnostici a cui può essere fatto riferimento i quali vengono descritti in pubblicazioni specifiche quali: Spedizione sicura di campioni e materiali infetti. (Manuale di biosicurezza in laboratorio. Annali dell' ISS. Supplemento al n° 2, vol 31, pagg 44-49, 1995) e Circolare del Ministero della Salute dell'8 maggio 2003: Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici.

#### *Sicurezza del personale*

E' essenziale che ogni istituzione da cui dipendano laboratori in cui si manipolano materiali potenzialmente contenenti micobatteri, adotti una politica di sicurezza, un codice di sicurezza e un programma di supporto che ne permetta l'attuazione. La responsabilità di tutto questo è del Direttore dell'istituzione o del laboratorio, che può però delegare certe incombenze ad un responsabile della sicurezza o ad altri responsabili specializzati. Va comunque sottolineato che la sicurezza del laboratorio è responsabilità di tutto il personale, e che ogni singolo operatore è responsabile per la propria sicurezza e per quella dei colleghi. Coloro che lavorano in laboratorio devono riportare ai propri superiori qualsiasi condizione o atto pericolosi. Sono auspicabili verifiche periodiche di sicurezza a cura di consulenti o specialisti esterni indipendenti. Per maggiori dettagli si può fare riferimento a pubblicazioni di natura generale quali: Organizzazione e addestramento per la sicurezza. In: Manuale di biosicurezza in laboratorio. Annali dell' ISS. Supplemento al n° 2, vol 31, pagg 87-108, 1995, oppure specificamente rivolte alla necessità di eseguire il test tubercolinico sui lavoratori esposti al rischio di infezione con *Mycobacterium tuberculosis* quali: Linee Guida per il controllo della tubercolosi, GU 18.02.99, Serie Generale n° 40, pagine 15- 17, 30, 44-45, tabella 4.

#### *Sicurezza dell'ambiente*

Poiché la tubercolosi è una malattia a trasmissione aerea, il rischio di contrarre l'infezione nei laboratori in cui vengono manipolati materiali contenenti micobatteri è stimata essere da tre a cinque volte superiore rispetto agli altri laboratori. Ciò dipende soprattutto dal passaggio dei micobatteri in sospensioni aeree (aerosol) durante le comuni manipolazioni di laboratorio quali agitazione dei campioni, centrifugazione, uso di pipette, ecc.

Il Decreto legislativo n° 626 del 19.9.94 riguardante l'attuazione di varie direttive CEE per il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori nel luogo di lavoro classifica *Mycobacterium tuberculosis* nel gruppo 3. Viene pertanto raccomandato di manipolare i micobatteri appartenenti al complesso *Mycobacterium tuberculosis* o i campioni sospetti di contenere *Mycobacterium tuberculosis* in una zona di lavoro con un livello di contenimento 3 (stanza P3) all'interno della quale esista una pressione negativa rispetto all'ambiente esterno e in cui l'aria estratta venga filtrata mediante filtri ad alta efficienza (High Efficiency Particulate Air, HEPA) prima di essere immessa nell'ambiente.

Per maggiori dettagli si può fare riferimento a pubblicazioni di natura generale quali: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition, 1999 (<http://bmbi.od.nih.gov/>) oppure: G.U. 126 del 01.06.2001 (DL 12.04.01 n° 206) per la manipolazione dei microorganismi geneticamente modificati (MOGM).

Utili indicazioni sono anche riportate in: Il Laboratorio di sicurezza – Livello di biosicurezza 3. In: Manuale di biosicurezza in laboratorio. Annali dell' ISS. Supplemento al n° 2, vol 31, pagg 19-22, 1995; in: Goals for working safely with M.tuberculosis in clinical, public health, and research laboratories (<http://www.cdc.gov/od/ohs/tb/tbdoc2.htm>), CDC, 1997; ed in: Tubercolosi, epidemiologia, diagnosi e terapia. I Manuali (MD 35). Accademia nazionale di Medicina, 2000, pag 203-206

## **PARTE TECNICA**

### **1. RACCOLTA DEI CAMPIONI PER LA RICERCA DEI MICOBATTERI**

La ricerca può essere effettuata su qualsiasi tipo di materiale biologico e permette, in caso di reperimento di *Mycobacterium tuberculosis* complex, di fare diagnosi di tubercolosi. Il significato del ritrovamento di micobatteri non tubercolari deve essere attentamente valutato alla luce della clinica potendo costituire una semplice contaminazione, una colonizzazione o, più raramente, una micobatteriosi vera e propria.

#### *1.1. Modalità di raccolta*

Occorre utilizzare contenitori monouso di plastica sterili, con tappo a vite.

L'uso dei tamponi è da evitare, tuttavia, nell'impossibilità di ricorrere ad altri tipi di prelievo, essi possono essere utilizzati per prelevare il campione (usualmente materiale necrotico e/o purulento) che va poi stemperato in una modesta quantità (1-2 ml) di soluzione fisiologica posta al fondo di un contenitore di plastica sterile, con tappo a vite. La sospensione così ottenuta va inviata in laboratorio. Non devono essere utilizzati fissativi o conservanti. La raccolta deve essere effettuata prima dell'inizio della terapia antimicobatterica. Il campione deve essere inviato al laboratorio il più rapidamente possibile, per assicurare la sopravvivenza dei micobatteri e per evitare la moltiplicazione di eventuali microorganismi contaminanti.

Le principali caratteristiche dei campioni destinati alla ricerca dei micobatteri e le relative modalità di raccolta sono riportate di seguito e nella tabella 1.

#### Escreato

I pazienti debbono essere correttamente istruiti e controllati al momento della raccolta del campione. Il materiale ottimale è quello proveniente dalle basse vie respiratorie ottenuto tramite l'ausilio di robusti colpi di tosse. Una serie di 3 campioni raccolti in giorni diversi rappresenta l'approccio diagnostico standard. Sarebbe preferibile raccogliere e processare il campione nel medesimo contenitore.

#### Espettorato indotto

Per pazienti che hanno difficoltà ad espettorare, si consiglia l'inalazione di un aerosol di soluzione salina ipertonica (3-15%) sterile prodotta da un nebulizzatore ad ultrasuoni. I campioni così ottenuti vanno processati in ogni caso nonostante il loro aspetto non sia diverso da quello dei materiali non idonei (acquoso e salivare). Proprio per questo motivo, i campioni debbono essere chiaramente etichettati come "espettorato indotto" prima dell'invio in laboratorio.

#### Aspirato gastrico

Può essere necessario per quei pazienti, in particolare bambini, che non riescono ad espettorare neanche dopo induzione aerosolica. Il campione (circa 50 ml) va raccolto al mattino presto dopo almeno 8-10 h di digiuno mediante sondino naso-gastrico e subito neutralizzato aggiungendo 100 mg di carbonato di sodio oppure può essere centrifugato risospesando il sedimento in 5-10 ml di tampone fosfato 0,067 M a pH 6,8 in attesa della successiva decontaminazione.

#### Broncoaspirati e lavaggi broncoalveolari

Si ottengono in corso di broncoscopia a fibre ottiche durante la quale possono essere eseguite anche altre procedure diagnostiche quali lo spazzolamento bronchiale e/o la biopsia transbronchiale. Talvolta può essere utile raccogliere ed esaminare l'escreato post broncoscopia solitamente prodotto dopo l'indagine e/o il mattino successivo.

#### Urine

La prima urina del mattino raccolta con la tecnica del mitto intermedio rappresenta il campione ottimale. Sebbene una serie di 3 campioni raccolti in giorni diversi rappresenti l'approccio diagnostico standard, talvolta la ricerca dei micobatteri può richiedere la raccolta di campioni multipli. La presenza di antibiotici ad ampio spettro presenti nelle urine può ritardare o inibire la crescita dei micobatteri.

### Sangue

Il campione va raccolto in provette eparinate (litio eparina) o mediante il sistema di lisi centrifugazione Isolator (Oxoid). Campioni raccolti in provette con EDTA non sono idonei per la coltura.

### Liquor

E' necessario raccogliere in provette sterili una quantità minima di almeno 2 ml. In caso di quantità insufficiente, la precedenza deve essere accordata all'esame colturale data la scarsissima sensibilità dell'esame microscopico.

### Tessuti ed altri liquidi corporei

I tessuti (bioptici o autoptici) vanno raccolti in contenitori sterili senza alcun fissativo. Per evitare l'essiccamento può essere aggiunta una modesta quantità (1-2 ml) di acqua o soluzione fisiologica sterile. I liquidi cavitari vanno raccolti in provette con litio eparina o sodio citrato per evitare che coagulino.

### Feci

Il campione ( $\geq 1$  g) va raccolto in contenitori di plastica trasparente ed inviato in laboratorio. E' opportuno pretrattare le feci allestendo una sospensione omogenea in soluzione fisiologica ottenibile vortexando le feci in presenza di palline di vetro e filtrandole analogamente a quanto viene fatto per la ricerca dei parassiti fecali.

Si raccomanda di limitare al massimo l'utilizzo di questi campioni per la diagnosi di tubercolosi in quanto causa di risultati inattendibili o potenzialmente fuorvianti.

TABELLA 1: Campioni per la ricerca di micobatteri

Materiale	Quantità	N° campioni	Campioni non idonei
Aspirato gastrico	≥5/10 ml raccolto al mattino a digiuno	3 in giorni consecutivi	Campioni non neutralizzati con carbonato di sodio
Broncoaspirato, lavaggio broncoalveolare, spazzolatura bronchiale, aspirato transtracheale	≥5 ml		
Espettorato	5-10 ml raccolto al mattino	3 in giorni consecutivi	Saliva, pool di escreti
Espettorato indotto	5-10 ml raccolto al mattino	3 in giorni consecutivi	Campioni non etichettati come "espettorato indotto"
Feci	≥1 g		Campioni congelati
Liquidi cavitari	Almeno 5-10 ml in provette con eparina		
Liquor cefalorachidiano	≥2 ml		
Materiale da lesioni cutanee			Tamponi con terreno di trasporto
Midollo osseo	La massima possibile in provetta con eparina o Isolator		Campione coagulato, campione in provetta con EDTA
Prelievi biotici	≥1 g di tessuto		Campioni in formalina
Pus	La massima possibile		Tamponi con terreno di trasporto
Sangue	10 ml in provetta con eparina o Isolator	3 a distanza di 24 ore l'uno dall'altro	Sangue coagulato, sangue in provetta con EDTA
Sangue mestruale	Alcuni ml, raccolti al 2°-3° giorno di flusso mestruale in provetta con eparina		Sangue coagulato
Urine	La prima urina del mattino (almeno 40 ml), taluni suggeriscono la tecnica del mitto intermedio	3 in giorni consecutivi	Urine delle 24h, urine da sacca

### 1.2. Modalità di conservazione e trasporto

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 2 giorni, periodo per il quale è preservata la vitalità dei micobatteri. Fanno eccezione le emocolture che vanno conservate a temperatura ambiente.

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 Salute n° 3 dell'8 maggio 2003. Utili indicazioni sono anche contenute in: Spedizione sicura di campioni e materiali infetti. In: Manuale di biosicurezza in laboratorio. Annali dell' Istituto Superiore di Sanità. Supplemento al n° 2, vol. 31, pag. 44-49, 1995.

### 1.3. Idoneità dei campioni

Campioni non idonei o pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere accettati, segnalando al clinico i motivi del rifiuto. Tali campioni dovrebbero essere tuttavia conservati per almeno 2 giorni per fornire al clinico l'opportunità di richiederne, in via eccezionale, il trattamento nel caso di impossibilità di raccogliere un campione adeguato.

## 2. FLUIDIFICAZIONE E DECONTAMINAZIONE DEI CAMPIONI

La maggior parte dei campioni clinici contengono svariati microrganismi diversi dai micobatteri. Se questi contaminanti a rapida crescita non vengono eliminati, essi impediranno lo sviluppo dei più lenti micobatteri nei terreni di coltura. E' anche necessario fluidificare i campioni clinici affinché il decontaminante possa raggiungere i germi contaminanti ed i micobatteri, liberati dai detriti organici, possano accedere ai nutrienti presenti nei terreni di coltura in cui saranno successivamente inoculati. Dal momento che i micobatteri sono più resistenti degli altri batteri ai trattamenti con acidi ed alcali, queste sostanze sono state ampiamente utilizzate per garantire l'isolamento dei micobatteri dai materiali clinici.

2.1. Metodo NALC-NaOH. 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.

### 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. Al riguardo, è utile ricordare che sono disponibili prodotti commerciali pronti all'uso che evitano la preparazione delle soluzioni stock e/o del tampone fosfato.

### Procedimento

- Nel provettone (a fondo conico, 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 ripetutamente il provettone al vortex per non più di 30 secondi 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 ad almeno 3.000 x g per 15-20 minuti possibilmente in centrifuga refrigerata a 4°C.

- 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 sull'agar-sangue 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 e il 5%; se la percentuale di contaminazioni è al di sotto dei 3%, il processo di decontaminazione è troppo energico, se invece supera il 5% il decontaminante è troppo debole o la fluidificazione è incompleta.

### **3. ESAME MICROSCOPICO**

L'esame microscopico è un test rapido che permette di evidenziare i micobatteri quando sono presenti in carica elevata nel campione clinico. Nonostante la bassa sensibilità, esso può essere eseguito su tutti i materiali, l'unica eccezione è rappresentata dai campioni di sangue nei quali l'eventuale carica batterica è praticamente sempre inferiore alla soglia di sensibilità del metodo. Normalmente lo striscio viene allestito a partire dal sedimento del campione ottenuto alla fine della decontaminazione prima di risospenderlo in soluzione fisiologica o acqua distillata per la successiva messa in coltura. Per i laboratori aventi una routine giornaliera inferiore ai cinque vetrini la colorazione da eseguire è quella di Ziehl-Neelsen (o in alternativa quella di Kinyoun); per quelli con maggior carico di lavoro è consigliata la colorazione in fluorescenza.

#### *3.1. Preparazione dello striscio*

- 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 tenere di riserva in caso di rottura, di difetti di colorazione o per controllare positività dubbie.
- Trasferire una porzione significativa del campione sulla superficie del vetrino utilizzando un'ansa o una pipetta. Distribuire il materiale su una superficie di circa 1.5 x 1.5 cm, facendo attenzione che il preparato non risulti eccessivamente spesso.

Per i campioni concentrati (tramite centrifugazione per 15 min. ad almeno 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 2h.
  - 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*

Di tutte le colorazioni sotto riportate esistono kit commerciali contenenti le soluzioni pronte all'uso con scadenza ad un anno circa.

##### *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%. Filtrare su carta bibula. Conservare a temperatura ambiente per 3 mesi.
- Decolorante: aggiungere 3 ml di acido cloridrico concentrato a 97 ml di etanolo al 95%. Conservare a temperatura ambiente per 3 mesi.
- Colorante di contrasto: sciogliere 0.3 g di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente per 3 mesi.

Procedimento

- Coprire il vetrino con carbolfucsina. Scaldare gentilmente il vetrino, fino alla formazione dei primi vapori, passando 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 secondi, finché non vi sia più traccia di colorante nell'acqua del lavaggio che segue ad ogni passaggio con decolorante.
- Colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi
- 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. Filtrare su carta bibula. Conservare a temperatura ambiente per 3 mesi.
- Decolorante: aggiungere 3 ml di acido cloridrico concentrato a 97 ml di etanolo al 95%. Conservare a temperatura ambiente per 3 mesi.
- Colorante di contrasto: sciogliere 0.3 g di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente per 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 secondi, finché non vi sia più traccia di colorante nel lavaggio con acqua che segue ad ogni passaggio con decolorante.
- Colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi
- 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. Conservare al buio in bottiglia scura a temperatura ambiente per 3 mesi.
- Decolorante: aggiungere 0.5 ml di acido cloridrico concentrato a 100 ml di etanolo al 70%. Conservare a temperatura ambiente per 3 mesi.
- Colorante di contrasto: sciogliere 0.5 g di permanganato di potassio in 100 ml di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente per 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 20X o, preferibilmente, da 40X.

I micobatteri appaiono fluorescenti in giallo contro lo sfondo scuro. Nei casi dubbi si può ricolorare con carbolfucsina il preparato già colorato con auramina.

### 3.3 Refertazione

Se negativo refertare: "negativa la ricerca di bacilli alcol-acido resistenti".

Se positivo refertare sulla scorta dello schema riportato in tabella 2, in base al tipo di colorazione utilizzata ed al numero di bacilli alcol-acido resistenti presenti nei campi microscopici osservati

TABELLA 2: Schema di refertazione.

Carbolfucsina (100x)	Auramina (40x)	Referto
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	++++

Data la correlazione esistente fra carica bacillare presente nelle secrezioni polmonari e rischio di trasmissione interumana della malattia, i referti di positività microscopica debbono essere comunicati al clinico il più velocemente possibile e di norma entro 24 ore lavorative dal momento della consegna del campione.

#### Controllo di qualità

Un vetrino di controllo positivo ed uno negativo debbono essere inclusi una volta a settimana e ad ogni nuovo lotto di coloranti. Possono essere utilizzati a tale scopo colture positive preferibilmente da terreno liquido ed un ceppo batterico di *Escherichia coli*. Si raccomanda inoltre la partecipazione ad un programma di valutazione esterna di qualità (VEQ) per la microscopia dei BAAR.

### **4. IDENTIFICAZIONE DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX DIRETTAMENTE DAI CAMPIONI CLINICI**

#### 4.1. INTRODUZIONE

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 di *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici, sia respiratori che extra-polmonari. Le tecniche di amplificazione, sia "home made" 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 permette di ottenere in poche ore milioni di copie delle sequenze nucleotidiche selezionate consentendo quindi di abbreviare enormemente i tempi della diagnostica di laboratorio in confronto alla coltura.

Nelle tecniche di amplificazione comunemente usate per la ricerca diretta di *Mycobacterium tuberculosis* complex l'oggetto dell'amplificazione può essere l'acido nucleico (DNA o RNA) comunemente definito "target" oppure la sonda.

#### 4.2. I TEST COMMERCIALI

##### 4.2.1. Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (MTD, GenProbe, bioMérieux)

###### Principio

E' un test di amplificazione attualmente validato per la ricerca qualitativa del rRNA di *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria (espettorati, tracheo-aspirati, bronco-aspirati, bronco-lavaggi). 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 l' rRNA target, tramite la trascrizione di molecole intermedie di DNA. Le molecole di RNA amplificato (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 3 ore.

###### Procedimento

I campioni clinici vengono sottoposti all'amplificazione MTD dopo essere stati decontaminati con NALC-NaOH. 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 scongelati e ricongelati più volte. La quota di campione utilizzata per il test è di 450 µl. Il sistema MTD necessita, oltre al luminometro, di un sonicatore e di due blocchi riscaldanti a diverse temperature. 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. I materiali contenuti nel kit permettono l'esecuzione di 50 test. Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit. La lettura finale viene effettuata al luminometro: si considerano negativi valori di RLU (relative light unit) <30.000 e positivi valori di RLU >30.000. I campioni con valori di RLU compresi tra 30.000 e 500.000 dovrebbero essere ritestati.

#### Controllo di qualità

La procedura prevede l'inserimento di controlli, positivi e negativi di amplificazione che vengono forniti con il kit. Qualora MTD risulti negativo in presenza di forte sospetto clinico di tubercolosi e/o di esame microscopico positivo per BAAR, 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 una sospensione 0.5 McFarland di un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177 o 27294). Se il risultato del test rimane negativo risulta confermata la presenza di inibitori.

#### 4.2.2. Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* complex (Roche)

##### Principio

È un test di amplificazione mediante PCR validato 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; 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 di 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 di amplificazione (CIA) costituito da DNA plasmidico con regioni di legame per i primer uguali a quelle della sequenza di *Mycobacterium tuberculosis* complex 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 regione *Mycobacterium tuberculosis* complex-specifica 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 sulla superficie di particelle magnetiche. L'aggiunta di un substrato cromogeno determina la formazione di un complesso colorato che viene rilevato con tecnica colorimetrica.

##### Procedimento

Il sistema Amplicor necessita, oltre allo strumento Cobas che esegue automaticamente le fasi di amplificazione e rivelazione, di un blocco riscaldante e di una piccola ultracentrifuga. La procedura deve essere eseguita in tre aree separate, una per la preparazione dei reagenti (master mix), una per la preparazione del campione e dei controlli ed una per l'amplificazione e la rivelazione. La quota di campione decontaminato utilizzata per il test è di 100 µl. I materiali contenuti nel kit permettono l'esecuzione di 96 test. Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit. Il test può essere completato in circa 6 ore.

##### Controllo di qualità

In ogni seduta si devono inserire un controllo positivo e tre controlli negativi. Il controllo positivo deve dare una densità ottica =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 un ceppo di riferimento (ATCC 25177 o 27294).

#### 4.2.3. ProbeTec ET *Mycobacterium tuberculosis* complex (Becton Dickinson)

##### Principio

È un test di amplificazione da utilizzare per la ricerca qualitativa del DNA di *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria.

La ricerca diretta di *Mycobacterium tuberculosis* complex si basa sull'amplificazione e rilevazione simultanee (real-time) del DNA bersaglio tramite primer di amplificazione e una sonda di rilevazione marcata con un agente fluorescente. Il sistema ProbeTec utilizza la tecnologia Strand Displacement Amplification (SDA) come metodo di amplificazione qualitativa del target costituito dal segmento di inserzione 6110 (IS 6110) presente in più copie all'interno del genoma di *Mycobacterium tuberculosis* complex. L'SDA è una tecnica di amplificazione isoterma a 52.5°C, basata sulla capacità di un enzima di restrizione di tagliare un filamento di DNA in corrispondenza del suo sito di riconoscimento e sulla capacità della DNA polimerasi di iniziare la trascrizione a partire dal taglio, rimuovendo lungo il percorso il filamento che viene trascritto, mentre il filamento restante serve successivamente da stampo per nuove amplificazioni. Le fasi di taglio e polimerizzazione/rimozione si ripetono ciclicamente producendo copie complementari a singolo filamento del DNA target.

Infine, l'ibridizzazione del probe specifico con il prodotto di amplificazione ne modifica la conformazione sterica consentendo l'emissione di un segnale fluorescente.

Il sistema SDA si serve di due micropozzetti monouso distinti che contengono al fondo i reattivi necessari per la reazione. Il micropozzetto di priming contiene i primer di amplificazione, le sonde di rilevazione marcate e altri reagenti; il micropozzetto di amplificazione contiene l'enzima di restrizione e la DNA polimerasi. Ogni reazione coamplifica e rileva un CIA. In base alla lettura del CIA che di regola deve risultare sempre positivo, i risultati del campione vengono espressi tramite un algoritmo come positivi, negativi o indeterminati.

##### Procedimento

Il sistema ProbeTec necessita, oltre allo strumento omonimo che esegue simultaneamente le fasi di amplificazione e rivelazione (real-time), di due blocchi riscaldanti, un sonicatore, un fornello per l'inattivazione dei micobatteri e una piccola ultracentrifuga. La procedura proprio in virtù della peculiarità real-time dell'SDA, può essere eseguita in un'unica area. La quota di campione decontaminato utilizzata per il test è di 500 µl. I materiali contenuti nel kit consentono l'esecuzione di 96 test. Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit. Il test può essere completato in circa 3 ore.

##### Controllo di qualità

La procedura prevede l'utilizzo di un controllo positivo e di uno negativo per ogni seduta analitica. È 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 riferimento (ATCC 25177 o 27294).

#### 4.3. USO CLINICO DEI TEST DI AMPLIFICAZIONE.

In uno studio di metanalisi sono stati esaminati 91 lavori che valutano i test molecolari in confronto all'esame colturale. Complessivamente essi includono 36.879 campioni di cui 6.429 con esame colturale positivo per *Mycobacterium tuberculosis* complex. I test molecolari utilizzati erano Amplicor (24 studi), MTD-1ª versione (17), LCx (13), MTD-2ª versione [E-MTD] (10), BDProbe-Tec (8), Fast-Plaque (2), Qbeta replicasi (2), PCR "home made" (38). Globalmente, i test molecolari dimostrano una sensibilità dell'89% ed una specificità del 96%. I test molecolari sono risultati più sensibili dell'esame microscopico che dimostrava negli stessi campioni una sensibilità e specificità del 72 e del 95%, rispettivamente.

L'impiego dei test molecolari è stato raccomandato per la tipizzazione dei campioni con esame microscopico positivo in quanto la sensibilità dei test è significativamente maggiore in questi campioni rispetto a quelli con esame microscopico negativo. Considerati complessivamente, i test molecolari dimostrano una sensibilità del 97% ed una specificità dell'84% nei campioni con esame microscopico positivo (61 studi, 4532 campioni, 3276 coltura-positivi) contro una sensibilità del 70% ed una specificità del 97% in quelli con esame microscopico negativo (85 studi, 29294 campioni, 1760 coltura-positivi). Va a questo proposito rilevato che la specificità dei test è stata viziata nella

maggior parte degli studi pubblicati dall'inclusione di campioni con coltura negativa provenienti da pazienti con tubercolosi in corso di terapia antibiotica. Infatti, nei 12 studi in cui il trattamento anti-tubercolare era chiaramente definito come criterio di esclusione, la specificità dei test molecolari nei campioni con esame microscopico positivo risultava più elevata (90%, intervallo fiduciale 89-96%).

Per quanto riguarda E-MTD (Gen-Probe) ed Amplicor (Roche), (i due kit commerciali più diffusi il cui impiego è stato approvato dall'FDA (USA) per la tipizzazione dei campioni risultati positivi per BAAR all'esame microscopico ed incluso in un algoritmo diagnostico della tubercolosi polmonare stilato dai CDC (USA), la meta-analisi ha dato i seguenti risultati: E-MTD veniva valutato in 10 studi, che includevano 5103 campioni, di cui 797 coltura-positivi e 1044 microscopico-positivi, ed Amplicor veniva valutato in 24 studi che includevano 9565 campioni, di cui 1587 coltura-positivi e 1290 microscopico-positivi. L'accuratezza diagnostica globale di E-MTD era del 90 e del 95%, in confronto al 61 ed 89% rispettivamente dell'esame microscopico sugli stessi campioni. L'accuratezza diagnostica globale di Amplicor era dell'88 e del 94%, in confronto ad un tasso di veri positivi e veri negativi dell'esame microscopico del 72 e del 96% rispettivamente, negli stessi campioni. Per quanto riguarda l'accuratezza nei campioni positivi o negativi all'esame microscopico, E-MTD dimostrava sensibilità e specificità del 97 e del 96 nei campioni microscopico-positivi (9 studi, 1010 campioni, 567 coltura-positivi) e del 77% e del 95%, rispettivamente, nei campioni microscopico-negativo (10 studi, 4053 campioni, 199 coltura-positivi). I valori di sensibilità e specificità di Amplicor nei campioni con esame microscopico positivo (17 studi, 1290 campioni, 971 coltura-positivi) erano 98 e 75% rispettivamente, mentre erano 64 e 98%, rispettivamente, nei campioni con esame microscopico negativo (22 studi, 8119 campioni, 445 coltura-positivi).

Alla luce di quanto detto, è possibile avanzare alcuni suggerimenti pratici all'uso dei test di amplificazione commerciali. I test precedentemente descritti hanno la capacità di individuare *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente nei campioni respiratori in poche ore dimostrando, a condizione che vengano impiegati sulla base di un sospetto clinico consistente, di fornire risultati dotati di buona sensibilità e di specificità quasi ottimale rispetto al gold standard costituito dalla combinazione di esame colturale e diagnosi clinica. Vi possono essere risultati falsamente positivi dovuti alla possibile contaminazione da acidi nucleici amplificati precedentemente. La maggior parte dei kit commerciali contengono tuttavia sistemi di vario genere che permettono di minimizzare la frequenza delle contaminazioni.

Pur essendo una metodica interamente manuale, MTD ha mostrato una buona sensibilità anche in campioni microscopico-negativi ed in campioni extra-polmonari. Recenti studi hanno tuttavia evidenziato una non trascurabile vulnerabilità all'azione delle sostanze inibenti. Per quanto riguarda i più recenti Cobas Amplicor e ProbeTec ET (entrambi automatizzati nelle fasi di amplificazione e rilevazione), pur essendo lievemente meno sensibili di MTD essi dispongono del CIA che mette al riparo da risultati falsi negativi legati ad inibizione del campione. Gli inibitori sono ancora largamente sconosciuti, ma è noto che essi possono interagire in maniera disomogenea con i diversi sistemi di amplificazione. La corretta preparazione del campione e le fasi di lavaggio, ma in particolar modo la presenza del CIA rappresentano i punti chiave per la riduzione o la eliminazione degli inibitori.

Identificare rapidamente *Mycobacterium tuberculosis* complex diventa estremamente importante in particolari categorie di pazienti quali i pazienti HIV-positivi ed immunodepressi in genere. Costoro sono frequentemente infettati anche da micobatteri non tubercolari (MNT), soprattutto *Mycobacterium avium* complex. 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 del tipo di infezione micobatterica. Inoltre, dal momento che l'amplificazione degli acidi nucleici (particolarmente, ma non solo il DNA) coinvolge anche i micobatteri non più vitali è inutile l'uso dei test di amplificazione a scopo prognostico nei pazienti in corso di terapia.

Infine, sebbene i test di amplificazione permettano di identificare *Mycobacterium tuberculosis* complex in tempi estremamente brevi, la loro sensibilità è attualmente inferiore a quella della coltura. Al riguardo è fortemente raccomandato che l'uso dei test di amplificazione non prescindano in nessun caso dalla contemporanea esecuzione dei test tradizionali (microscopia e coltura) e che gli accertamenti diagnostici in oggetto vengano indirizzati presso un unico laboratorio, di norma quello che, per volume di lavoro ed esperienza, possa garantire la maggior competenza in materia.

## **5. ESAME COLTURALE**

L'esame colturale rappresenta il complemento imprescindibile dell'esame microscopico, deve pertanto essere sempre eseguito anche in assenza di richiesta. E' fortemente raccomandata l'esecuzione della coltura abbinando terreno solido e terreno liquido.

## 5.1. Coltura su terreni solidi

### Principio

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

### Reagenti

Il terreno di Löwenstein-Jensen (LJ) ed i terreni agarizzati Middelbrook 7H10 e Middelbrook 7H11 sono i più comunemente usati e sono normalmente confezionati in provette a becco di clarino.

### Procedimento

- Seminare circa 0.2 ml (3-5 gocce) di campione opportunamente decontaminato e/o concentrato, sulla superficie di ciascun terreno solido dopo aver rimosso l'acqua di condensa eventualmente presente al fondo della provetta. 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. 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. Protrarre l'incubazione per almeno 6 settimane; il prolungamento fino ad 8 settimane è comunque consigliato.
- 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 l'alcool-acido resistenza delle colonie eventualmente cresciute sui terreni di coltura eseguendo un preparato microscopico e discriminando così la crescita micobatterica dalle contaminazioni. Benché i terreni all'agar permettano una più precoce evidenziazione dei micobatteri, il Löwenstein-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 preparato 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*.

## 5.2. Coltura su terreni liquidi

Esistono in commercio numerosi terreni liquidi per micobatteri alcuni dei quali prevedono l'impiego di apparecchi automatici per l'incubazione e/o la lettura. Per l'impiego di tali terreni si rimanda alle istruzioni dei rispettivi produttori. Tali terreni sono contenuti in flaconi chiusi con un setto di gomma o in provette col tappo a vite. In genere è prevista l'aggiunta al terreno di coltura di un supplemento costituito da una miscela di antibiotici e da un arricchimento. Il volume di campione seminato è in genere di 0.5 ml e l'inoculo si effettua con una siringa (attraverso il setto di gomma) o con una pipetta (in presenza di tappo a vite).

La presenza di crescita viene rilevata, a seconda dei casi, da un apparecchio automatico o ad occhio; in ogni caso è indispensabile verificare la alcool-acido resistenza dei microrganismi sviluppatasi nel brodo per distinguere i micobatteri dagli eventuali contaminanti.

Schematicamente, i terreni/sistemi liquidi attualmente disponibili nel nostro paese si possono suddividere in

Manuali: Septi-Check AFB (Becton-Dickinson), MGIT (Becton-Dickinson) e MB-Redox (Biotest)

Semiautomatici:

Bactec 460 TB (Becton-Dickinson)

Automatici: Bactec 9000/F MB (Becton-Dickinson), Bactec MGIT 960 (Becton-Dickinson), ESP Culture System II (Difco) e MB/BacT (bioMérieux)

Si omette di riportare i singoli protocolli tecnici, per i quali si può fare riferimento alle indicazioni delle case produttrici.

Controllo di qualità

Controllare la fertilità di ogni nuovo lotto dei terreni o dei supplementi utilizzando ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* complex e *Mycobacterium fortuitum*.

## **6. EMOCOLTURA**

La ricerca dei micobatteri nel sangue è giustificata nei pazienti immunodepressi nei quali tali microorganismi possono dare luogo ad infezioni disseminate. Alcune ditte che commercializzano apparecchi automatici per la coltura dei micobatteri (Bactec 460 TB, Bactec 9000/F MB, ESP Culture System II e MB/BacT) mettono a disposizione dei flaconi dedicati che, una volta addizionati con un apposito arricchimento, possono essere inoculati direttamente col sangue del paziente.

Non disponendo di tali sistemi automatici l'emocoltura può essere eseguita ricorrendo al sistema della lisi-centrifugazione (Isolator).

### **6.1. Il sistema Isolator**

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 secondi.
- 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 destinati alla semina con sangue intero.

## **7. IDENTIFICAZIONE**

Mentre l'identificazione dei micobatteri non tubercolari è compito dei laboratori di riferimento, il riconoscimento dei micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex rientra nelle competenze dei laboratori che eseguono l'esame colturale.

### **7.1 NAP-test**

Il NAP-test è una prova di inibizione selettiva utilizzabile sulle colture eseguite col metodo radiometrico. Il NAP è capace di inibire lo sviluppo delle specie appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex mentre è tollerato dai micobatteri non tubercolari.

Reagenti

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

Procedimento

- Trasferire 1 ml dalla coltura suddetta, dopo averla ben omogeneizzata con una siringa, nel flaconcino contenente

il NAP. Qualora la coltura abbia un indice di crescita (Growth Index: GI) >100 è necessario diluirla secondo lo schema sottostante 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.

Controllo di qualità

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

Schema di diluizione

Growth index (GI)	Volume (ml) da trasferire in un nuovo flacone di 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

### 7.2 DNA-probe

I kit del sistema commerciale Accuprobe contengono 20 test con scadenza di circa un anno e consentono l'identificazione di alcune delle più comuni specie micobatteriche (*Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* complex e *Mycobacterium gordonae*). Pertanto almeno il kit per l'identificazione del *Mycobacterium tuberculosis* complex può essere sfruttato appieno anche dai laboratori di dimensioni medie.

Reagenti

- Kit AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* complex (Gen-Probe, bioMérieux).

Procedimento

- Trasferire una piccola quantità di coltura micobatterica nella provetta contenente 100 µl di tampone, 100 µl di soluzione lisante ed 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 incubare per 15 minuti a 60°C.
- Aggiungere il reattivo di "selezione" ed incubare per 10 minuti a 60°C.
- Dopo 5 minuti a temperatura ambiente effettuare la lettura utilizzando l'apposito luminometro. A seconda dell'intensità di luce emessa l'apparecchio fornisce direttamente il risultato "positivo" o "negativo". In caso di positività il ceppo in esame appartiene al *Mycobacterium tuberculosis* complex.

E' possibile impiegare i probes anche per l'identificazione delle colture in terreno liquido centrifugandone 1.5 ml per 20 minuti ad almeno 4000 x g ed eseguendo il test di ibridazione dopo aver trasferito 100 µl di sedimento nella provettina 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 il 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

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

### 7.3. Kit Multiplex

Sono disponibili kit commerciali in biologia molecolare che permettono di identificare 16 diverse specie micobatteriche fra le quali *Mycobacterium tuberculosis* complex (INNO-LiPA Mycobacteria e GenoType Mycobacteria, Innogenetics). Essi prevedono una fase di amplificazione (PCR) seguita da ibridazione inversa

dell'amplificato con sonde specie specifiche fissate su una unica striscia di acetato di cellulosa. Questi sistemi benché più indaginosi offrono risultati più attendibili rispetto all'Accuprobe in quanto scervi dai possibili falsi negativi biomassa dipendenti. La ditta Innogenetics produce anche un kit (INNO-LIPA Rif TB) per la rivelazione rapida della resistenza alla rifampicina. Si tratta di striscioline di nitrocellulosa contenenti sonde in grado di reagire con il prodotto di amplificazione del gene *rpoB*, previa estrazione del DNA del ceppo in esame. In caso di mutazioni intervenute nel gene *rpoB*, l'assenza e/o presenza di bande colorate sulle striscioline viene visualizzata in poche ore. Il test viene normalmente eseguito da coltura, ma è disponibile una metodica di nested PCR che ne consente l'applicazione direttamente sull'espettorato.

## **8. TEST DI SENSIBILITA' AI FARMACI**

I test di sensibilità in vitro per il bacillo tubercolare rispondono a tre esigenze principali: i) servono come guida alla scelta della terapia, ii) aiutano a confermare il sospetto clinico di una resistenza orientando verso i farmaci alternativi più idonei, iii) possono essere usati per stimare la prevalenza in una comunità delle resistenze primarie o acquisite. Essi dovrebbero essere eseguiti su tutti i primi isolamenti di *Mycobacterium tuberculosis* complex, sulle colture ancora positive dopo tre mesi di terapia e se sussiste una evidenza clinica di mancata risposta alla chemioterapia antitubercolare.

Queste linee guida descrivono due metodi proporzionali per la valutazione della farmaco sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis*: il saggio su terreno agarizzato Middlebrook 7H10 ed il saggio su terreno liquido radiometrico 7H12.

### **8.1. I farmaci antitubercolari**

I farmaci in polvere da utilizzare per il saggio di sensibilità possono essere richiesti alle industrie farmaceutiche produttrici o essere acquistati da altre fonti commerciali. Non utilizzare preparazioni parenterali standard. Una volta aperti i flaconi, le polveri devono essere conservate in un essiccatore a  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  o come raccomandato dal produttore. Di ciascun farmaco devono essere note potenza e data di scadenza.

La potenza del farmaco è rappresentata dai  $\mu\text{g}$  di farmaco attivo per mg di polvere del prodotto; essa non è mai corrispondente 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 entrambe le seguenti formule:

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

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

Le soluzioni madre devono essere preparate con acqua distillata sterile ad una concentrazione di almeno 1000  $\mu\text{g/ml}$  o dieci volte superiore rispetto alla più alta concentrazione da saggiare. Alcuni agenti che presentano una scarsa solubilità possono richiedere concentrazioni più basse. Le soluzioni madre devono essere sterilizzate per filtrazione (pori da 0.22  $\mu\text{m}$  di diametro) scartando la prima parte (10-15%) della soluzione che passa attraverso il filtro. Alcuni farmaci, non solubili direttamente in acqua, richiedono altri solventi come il metanolo, l'etanolo, o il dimetil-solfossido. In questo caso  $\$$  deve utilizzare la minima quantità di solvente necessaria a sciogliere la polvere, diluendo poi con acqua distillata o appropriato tampone per ottenere la concentrazione desiderata. Queste soluzioni sono autosterilizzanti. Le soluzioni madre possono essere conservate a  $-70^{\circ}\text{C}$  per sei mesi o più, in piccole aliquote senza significativa perdita di attività. Una volta scongelate, debbono essere utilizzate in giornata. La porzione di farmaco non usata, deve essere eliminata e mai ricongelata.

La concentrazione critica è, per ciascun farmaco, quella che inibisce la crescita della maggior parte dei microrganismi di un ceppo selvaggio di bacillo tubercolare, senza apprezzabili effetti sulla crescita di tutti i mutanti resistenti. Nella Tabella 3, elaborata in base alle direttive del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e tenendo in considerazione i più recenti dati della letteratura internazionale, 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 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, l'ofloxacina e la rifabutina sono farmaci di seconda scelta e dovrebbero essere saggiati solo in laboratori di riferimento in presenza di accertate resistenze ai farmaci di prima scelta. Per i farmaci di prima scelta sono disponibili preparazioni commerciali liofilizzate pronte all'uso da utilizzare con i vari sistemi liquidi automatici o semiautomatici attualmente disponibili.

Tabella 3.

Concentrazioni critiche raccomandate per i test di sensibilità di *Mycobacterium tuberculosis* mediante il metodo delle proporzioni in terreno solido (Middlebrook 7H10, 7H11 e LJ) e in sistemi commerciali liquidi (Bactec 460TB, MGIT 960, ESP II, BacT/Alert MB).

Farmaco	Solvente	Terreno/sistema e concentrazione (µg/ml)						
		7H10	7H11	LJ	Bactec 12B	ESP II	MGIT 960*	BacT/Alert MB*
Streptomycina	Acqua distillata	2.0	2.0	4.0	**2.0	-	1.0	0.9
		10.0	10.0	-	6.0	-	4.0	-
Isoniazide	Acqua distillata	0.2	0.2	0.2	**0.1	0.1	0.1	0.09
		1.0	1.0	-	0.4	0.4	0.4	0.4
Rifampicina	Metanolo	1.0	1.0	4.00	2.0	1.0	1.0	0.9
Etambutolo	Acqua distillata	5.0	7.5	2.0	**2.5	5.0	5.0	2.3
		-	-	-	7.5	8.0	7.5	-
Pirazinamide	Acqua distillata	NR	NR	-	***100.0	-	100.0	200.0
PAS	Acqua distillata	2.0	8.0	0.5	4.0	-	-	-
Etionamide	Dimetil solfossido	5.0	10.0	20.0	5.0	-	-	-
Kanamicina	Acqua distillata	5.0	6.0	20	5.0	-	-	-
Capreomicina	Acqua distillata	10	10	20	5.0	-	-	-
Ofloxacina	0.1 N NaOH	2.0	2.0	-	2.0	-	-	-
Rifabutina	Metanolo	0.5	0.5	-	1.0	-	-	-

PAS= Acido p-amino-salicilico; ESP (Extra Sensing Power) Culture System II; MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube).

\*: non ancora approvato dalla Food and Drug Administration (FDA).

\*\* : Concentrazione raccomandata;

\*\*\*: pH = 6.0;

NR = non raccomandato

(Adattato da: Ref. 2, 3, 17, 19, 20, 22)

### 8.2. Saggio su terreni solidi

Nel metodo delle proporzioni, una sospensione standardizzata del micobatterio in esame viene inoculata sulla superficie di una serie di terreni solidi contenenti i singoli farmaci e sulla superficie di un terreno di controllo. La stessa sospensione, diluita 100 volte, viene inoculata su una seconda serie di terreni col farmaco e su un terreno di controllo senza farmaco. Dopo il necessario periodo di incubazione, utilizzando quella diluizione che presenta sul terreno di controllo circa 100 colonie, si determina il numero di colonie cresciute sul terreno col farmaco. Se queste sono superiori all' 1% del controllo si considera il ceppo resistente a quel farmaco, altrimenti sensibile. Possono essere utilizzati per i test di sensibilità del *Mycobacterium tuberculosis*, sia i terreni a base di uovo (Löwenstein-Jensen) che i terreni agarizzati di Middlebrook (7H10 e 7H11). I terreni all'uovo vengono sconsigliati per l'esecuzione dei test di sensibilità, perchè i farmaci vengono parzialmente inattivati sia durante la solidificazione del terreno che a causa del legame con i fosfolipidi, le proteine e certi aminoacidi presenti nel terreno.

#### 8.2.1. 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 arricchimento OADC (Oleic acid, Albumin, Dextrose, Catalase) mantenuto liquido in bagnomaria

a 45-50°C.

Piastre di agar sangue e di Middlebrook 7H10.

#### Procedimento

Preparazione del terreno.

Distribuire 5 ml dell'agar senza farmaco in un quadrante di ciascuna piastra di Petri.

Aggiungere, ad una opportuna quantità di terreno fuso contenente l'arricchimento, la quantità di farmaco necessario per ottenere una concentrazione finale desiderata (Tabella 3).

Distribuire in ciascuno degli altri quadranti delle piastre 5 ml di agar contenente i singoli farmaci. Lasciare solidificare l'agar a temperatura ambiente e poi stoccare, per non più di un mese, in buste di plastica al buio a (4°C).

Un metodo alternativo ai farmaci in polvere, consiste nell'utilizzo di dischetti impregnati con quantità note di farmaco. In tal caso, i dischetti sono posti nei quadranti (Tabella 4) e ricoperti con 5 ml di terreno ancora liquido. Dopo la solidificazione del terreno, le piastre vengono incubate per una notte a 37°C per facilitare la diffusione dei farmaci nel terreno.

Tabella 4. Distribuzione dei dischetti con il farmaco secondo le indicazioni NCCLS

N° Piastra	N° Quadrante	Farmaco	Concentrazione del farmaco(µg/ml)	
			nel dischetto	finale
1	I	Controllo 1	-	-
	II	Isoniazide	1	0.2
	III	Isoniazide	5	1.0
	IV	Etambutolo	25	5.0
2	I	Controllo 2	-	-
	II	Streptomina	10	2.0
	III	Streptomina	50	10.0
	IV	Rifampicina	5	1.0

Inoculo ed incubazione.

Prelevare 5-10 colonie 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 alcuni 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 1 di Mc Farland.

Preparare delle diluizioni  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  della sospensione suddetta con acqua distillata sterile.

Accertarsi che la superficie del terreno sia asciutta, asportando eventuali gocce con un tampone di cotone sterile.

Inoculare i vari quadranti di una prima serie di piastre con sospensione  $10^{-2}$ , usando una pipetta Pasteur e ponendo, senza mai toccare l'agar, una goccia ai 3 angoli di ciascun quadrante. Tenere la pipetta perpendicolare al terreno per assicurare un inoculo uniforme delle gocce 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 7H11 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 in incubatore a  $CO_2$  a 36°C in atmosfera al 5-10% di  $CO_2$ .

Lettura ed interpretazione.

Esaminare per qualche giorno la piastra di agar sangue per verificare la purezza dell'inoculo e ripetere il test in presenza di contaminazione.

Esaminare il quadrante di controllo settimanalmente. Quando almeno 50 colonie vengono osservate, leggere tutti i quadranti. 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 il numero di colonie cresciute in ciascun quadrante. Fare attenzione alla presenza di microcolonie, evidenziabili con lo stereomicroscopio.

Interpretare i risultati ottenuti valutando la serie di piastre che presenta sul quadrante di controllo un numero contabile di colonie (idealmente 50-100). Antibigrammi con controlli <50 colonie possono mostrare false sensibilità. Antibigrammi con controlli che mostrano una crescita confluyente possono essere utilizzati solamente quando il ceppo risulti sensibile. In tal caso, la presenza di resistenze può essere dovuta ad un inoculo troppo pesante.

Calcolare la percentuale di resistenza dividendo il numero di colonie cresciute sul terreno col farmaco per il numero di colonie sul terreno di controllo e moltiplicare per 100. Interpretare il risultato come resistente quando la proporzione di crescita sul terreno col farmaco è  $\geq 1\%$  della crescita sul terreno di controllo. La presenza di microcolonie suggerisce che l'isolato può essere resistente ma che il farmaco ha qualche effetto sul ceppo e può essere attivo in combinazione con altri farmaci.

Refertare le concentrazioni dei farmaci e l'interpretazione.

L'esecuzione del test di sensibilità alla PZA su terreno a pH 6 è sconsigliato.

#### Controllo di qualità

L'attività 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 saggiato 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.

### 8.3. Saggio su terreni liquidi

#### 8.3.1 Saggio su terreno radiometrico Bactec

Sensibilità ai farmaci maggiori (streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo).

#### 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 stoccarle 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 il sabato (o il venerdì) e iniziare il lunedì la lettura dei flaconi inoculati.

- Testare preventivamente i flaconi Bactec 12B con lo strumento Bactec 460 TB 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 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 dei 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 la torbidità della sospensione con liquido di diluizione allo standard 1 di McFarland (o allo 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  $\pm$  1h) 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 più giorni. Se un flacone di controllo inoculato il sabato (o il venerdì) presenta un GI  $>30$  già il lunedì, l'inoculo è troppo denso ed il test deve essere ripetuto; se il GI è  $>30$  il martedì, leggere anche il mercoledì.
  - Calcolare, per il controllo e per ciascun flacone antibiotato, 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 con il farmaco, il ceppo è da considerare resistente. Se il  $\Delta$ GI del controllo è uguale al  $\Delta$ GI del flacone antibiotato, 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 con il 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.

Qualora risulti una resistenza all'isoniazide, si consiglia di ripetere il test alla concentrazione di 0.4  $\mu$ g/ml segnalandola al clinico come resistenza di basso livello (resistente a 0.1  $\mu$ g/ml, ma sensibile a 0.4  $\mu$ g/ml) o resistenza severa (resistente ad entrambe le concentrazioni).

#### 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 saggiato 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.

#### 8.3.2. Saggio radiometrico per la determinazione dell'attività della pirazinamide

##### 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. Qualora il GI sia >500 e <999, diluire la subcoltura con brodo Bactec 12B secondo lo schema riportato in tabella 5. Se invece il GI è >999 occorre preparare un nuovo inoculo.
- Saggiare preventivamente i flaconi di PZA Test Medium con lo strumento Bactec 460 TB per avere nei flaconi un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> (scartare eventuali flaconi con GI >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.
- Leggere giornalmente i flaconi per un minimo di 4 giorni, e quando il flacone di controllo raggiunge un GI di 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 con il farmaco è superiore all' 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. Questa metodica è considerata di riferimento per il saggio della pirazinamide e l'unica attualmente raccomandata dall'NCCLS.

#### Controllo di qualità

L'attività 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 saggiato 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

Tabella 5: Diluizione della coltura di inoculo per l'esecuzione dei test di sensibilità alla pirazinamide

Growth Index (GI)	Volume di diluente da aggiungere al flacone
500-599	1.0
600-699	1.5
700-799	2.0
800-899	2.5
900-999	3.5

### 9. LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA

Il laboratorio di micobatteriologia costituisce un ambiente di lavoro dove, per la pericolosità dei materiali processati, delle attrezzature usate e la complessità delle attività che vi si svolgono, deve essere posta una particolare attenzione alla tutela della salute e alla 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 *Mycobacterium tuberculosis* nel gruppo 3 (Tabella 6). Nell'allegato XII vengono inoltre elencate le specifiche per le misure di contenimento (Tabella 7).

Tabella 6. 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 di *Mycobacterium tuberculosis* è correlata alla bassa dose infettante nell'essere umano (50% della dose infettante <10 bacilli). L'incidenza dell'infezione tubercolare, fra il personale di laboratorio, è stimata essere da tre a cinque volte maggiore di quella di un individuo che svolge un altro lavoro.

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.)

Tabella 7. Specifiche sulle misure di contenimento e sui livelli di contenimento

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
Specifiche procedure di disinfezione	Si
La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	Raccomandato
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
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 (disponibile)
Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Si
Trattamento delle acque reflue	Facoltativo

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 esposizione e dalla sensibilità dell'ospite. Vengono riportate di seguito le vie di penetrazione e le relative attività lavorative che possono esporre al rischio di infezione.

### 9.1 Modalità di contagio.

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

Manipolare anse da batteriologia. Strisciare l'ansa su un terreno di coltura, soprattutto se la superficie è ruvida. Stendere del materiale sulla superficie di un vetrino. Raffreddare un'ansa di metallo nel terreno di coltura. Flambare un'ansa di metallo. Utilizzare impropriamente le pipette. Mescolare sospensioni batteriche. Scaricare la pipetta su una superficie dura. Manipolare aghi e siringhe. Espellere aria da tubi o bottiglie. Ritirare l'ago dal tappo di un flacone. Separare l'ago dalla siringa sotto pressione. Centrifugare materiale infetto, soprattutto quando si verifica un danno ai contenitori durante la centrifugazione. Utilizzare miscelatori, omogenizzatori, sonicatori, agitatori e vortex su campioni clinici o colture. Versare o travasare liquidi e rovesciare del materiale infetto. Aprire tappi o coperchi dei contenitori dei terreni di coltura. Liofilizzare e filtrare sotto vuoto. Gli aerosol contaminano persone, superfici, strumenti e canali di aerazione.

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

Pipettare a bocca. Porre materiale contaminato o dita in bocca. Mangiare, bere, usare rossetto o fumare nelle aree di lavoro

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

Manipolare aghi e siringhe. Maneggiare vetri rotti, bisturi e altri oggetti appuntiti o taglienti

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

Schizzare o rovesciare materiale infetto negli occhi, bocca, naso e sulla pelle. Esporre cute non intatta a materiale contaminato. Lavorare su superfici contaminate. Maneggiare equipaggiamento contaminato. Manipolare non correttamente anse, aghi da inoculo o tamponi contenenti campioni o materiale da coltura.

## *9.2 Procedure e pratiche microbiologiche standard*

Una buona tecnica microbiologica e l'adozione di 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 barriere di protezione facciale per prevenire la possibilità di schizzi di materiale. Bisogna lavare le mani dopo aver maneggiato materiali infetti e prima di lasciare il laboratorio. Nelle aree di lavoro deve essere vietato fumare, consumare cibo e bevande, conservare alimenti nei frigoriferi e applicare cosmetici. Non portare oggetti alla bocca. Le persone che portano lenti a contatto devono munirsi di occhiali di protezione o barriere di protezione facciale. Il laboratorio va tenuto pulito, in ordine e sgombro da qualsiasi oggetto non pertinente al lavoro. Minimizzare 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, di essere sottoposti a lavaggio per il riutilizzo (soluzione acquosa di ipoclorito di sodio per uso domestico diluita al 10% 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.

## *9.3 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 vanno tenute chiuse durante il lavoro. Aghi ipodermici e siringhe non vanno 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 con punte luer-lock.

Il fissaggio dei vetrini su una piastra riscaldata (65-80°C per 22.5 ore) può non uccidere tutti i micobatteri eventualmente presenti sulla superficie del vetrino e questo deve essere maneggiato con cura. L'aggiunta di un'uguale volume di ipoclorito di sodio al 5% (candeggina per uso domestico) al campione biologico nella preparazione del vetrino, ucciderà tutti i micobatteri.

In caso di incidenti o versamenti di colture micobatteriche bisogna evacuare l'area per almeno 30 minuti chiudendo le porte, per permettere all'aerosol di depositarsi. Entrare poi nella stanza dotati, se necessario, di maschera a viso interamente coperto, dotata di filtri ad alta efficienza per le particelle. Assorbire il versamento e disinfettare appena possibile l'area di versamento (soluzione acquosa di ipoclorito di sodio, 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. 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 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.

In tutte quelle procedure che comportino il rischio di contatto diretto accidentale con sangue e materiali infetti, devono essere indossati guanti adeguati al lavoro che si svolge. Dopo l'uso, i guanti contaminati dovrebbero essere eliminati e mai riutilizzati. Lavare le mani dopo aver tolto i guanti. Le piastre o le provette di coltura dei micobatteri devono essere chiuse ed eliminate attraverso sterilizzazione in autoclave e successivo smaltimento o mediante

incenerimento.

E' necessaria una sorveglianza sanitaria da parte del medico competente, con appropriati servizi di valutazione, monitoraggio degli operatori esposti a rischio ed eventuale trattamento.

#### *9.4 Equipaggiamento di biosicurezza raccomandato*

Cappe di sicurezza biologica a flusso laminare tipo II, da usarsi ogni qualvolta si eseguano operazioni che possono facilmente liberare aerosol e ci sia il rischio di infezioni per via aerea, come l'apertura di contenitori dopo centrifugazione, miscelazione, agitazione, rimescolamento vigoroso o sonicazione, e l'apertura di contenitori di materiali infetti, la cui pressione possa essere diversa da quella dell'ambiente circostante. Le cappe di sicurezza sono inoltre necessarie quando si manipolino forti concentrazioni o grandi volumi di materiali infetti. Non ostruire la griglia sul piano di lavoro della cabina di sicurezza con fogli, teli o apparecchiature, perchè si 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, registrando tutto in apposita scheda.

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

Propipette per evitare di pipettare a bocca, disponibili in vari tipi; dove possibile sono preferibili le pipette Pasteur in plastica anzichè in vetro o l'utilizzo di pipettatori automatici. Sterilizza anse elettrico, per ridurre la formazione di aerosol. Sono disponibili anse monouso in plastica. Porre le anse in un contenitore con sabbia ed una soluzione di fenolo al 5% o di alcool al 95% per rimuovere l'eccesso di inoculo prima dell'incenerimento.

Barriere di protezione facciale (occhiali, maschera o visiera protettiva) necessarie per la manipolazione di materiali infetti fuori dalla cappa di sicurezza biologica. Provette e bottiglie con tappo a vite per conservare campioni e colture. Autoclavi per sterilizzare i 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 nel caso in cui venga prodotto aerosol.

Durante il lavoro devono essere indossati indumenti di laboratorio come camici lunghi o grembiuli o divise in plastica monouso impermeabili, tute, copricapi, eventuali coperture per le scarpe o calzature speciali. Non sono adatti i camici con apertura anteriore. 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 vanno 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 sulle 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 incontrino determinati requisiti strutturali; prive di punte, spigoli taglienti e di parti in movimento non protette, progettate, costruite ed installate per garantire semplicità d'uso manutenzione, pulizia, 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 scarsa pratica o informazione, distrazione o eccessiva confidenza con il rischio biologico, compromettendo spesso l'efficacia delle migliori misure di sicurezza e delle apparecchiature fornite appositamente per la protezione dell'operatore. Sono oggi disponibili conoscenze tecniche e strumentali che consentono di prevenire la maggior parte delle infezioni in laboratorio.

#### *9.5 Struttura del laboratorio.*

Una corretta progettazione strutturale del laboratorio e le adatte apparecchiature consentono di ridurre notevolmente il rischio di infezione in laboratorio, ed è quindi importante la loro corrispondenza funzionale con i criteri di sicurezza dettati dalla legislazione vigente sulla sicurezza (Tabella 7). Pur non esistendo requisiti specifici

per la ventilazione, questa dovrebbe essere regolata per consentire diversi ricambi d'aria ogni ora, con temperature tra 20 e 23°C e umidità dell'aria del 50-60%. L'aria dovrebbe poter essere estratta mediante filtri HEPA ed avere la possibilità di estrazione completa terminale ed immissione all'esterno dell'aria filtrata. Se non esiste aerazione meccanica, le finestre devono essere apribili e, preferibilmente, dotate di reti contro gli insetti.

A titolo di esempio, viene di seguito riportata la descrizione del laboratorio di contenimento P3 del Dipartimento di Malattie infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità. La struttura è formata da una anticamera, uno spogliatoio e un laboratorio P3 vero e proprio. Il laboratorio e lo spogliatoio sono a pressione negativa (5 e 4 mm di acqua, rispettivamente) rispetto all'ambiente esterno. Il numero di ricambi d'aria è circa 10 per ora. Nel laboratorio e nello spogliatoio l'aria ricircolata (circa 80%) e l'aria estratta (circa 20%) vengono filtrate continuamente mediante filtri HEPA.

Nell'anticamera si trovano un pannello elettrico e i sistemi di comando automatico della fumigazione con formalina delle cappe e del laboratorio, la porta di accesso allo spogliatoio, un interfono, due Magnehelic per la misurazione delle depressione dello spogliatoio e del laboratorio, una finestra di ispezione per poter vedere l'interno del laboratorio, un'autoclave passante, un passavivande per l'entrata dei materiali sterili, un lavandino, un portello di ispezione del sistema di condizionamento dell'aria. Nell'anticamera si trovano anche un registro di accesso al laboratorio e l'elenco delle persone autorizzate a lavorarvi, oltre al nome del responsabile. E' anche disponibile un manuale operativo e di sicurezza relativo alle operazioni da effettuare sia nella routine lavorativa che in caso di incidente. Sulla porta di ingresso che da sul corridoio è apposto il simbolo internazionale di rischio biologico.

Nello spogliatoio si trovano gli armadietti per riporre abiti e materiali e un tappeto adesivo battericida/batteriostatico per prevenire il diffondersi di contaminazioni batteriche dal laboratorio allo spogliatoio quando si tolgono le sovrascarpe. La porta esterna dello spogliatoio è collegata tramite un interblocco elettrico con la porta interna che da verso il laboratorio, in modo che le due porte non possano mai essere aperte nello stesso momento.

Il laboratorio P3 è attrezzato con :

- Due cappe biologiche di classe II munite di un sistema indipendente da quello del laboratorio di estrazione dell'aria e di due gruppi di continuità indipendenti (batterie) che alimentano le cappe anche in caso di mancanza di energia elettrica. Per la disinfezione gassosa, da effettuare soprattutto in caso di incidenti gravi, si devono far evaporare in un beker 35 ml di formalina per metro cubo al 70% di umidità per almeno 8 ore (Manuale di Biosicurezza in Laboratorio. Annali dell'ISS. Supplemento al n° 2, vol 31, pagina 57). In pratica, per una cappa di medie dimensioni (0.6 metri cubi) si devono fare evaporare 80 ml di formalina al 10% (formalina del commercio al 40% diluita 1:4 con acqua) per una notte.
- Una centrifuga refrigerata munita di un sistema anti-aerosol in cui i contenitori delle provette poste sui bracci della centrifuga, sono chiusi con un coperchio a vite. Tutte le provette devono avere il tappo a vite e i contenitori con le provette devono essere riempiti e aperti solo sotto la cappa biologica.
- Una coppia di termostati a 37°C e 5% di anidride carbonica muniti di sistema di autosterilizzazione.
- Un telefono
- Apparecchiature varie

I campioni biologici contenenti micobatteri o altri organismi del gruppo 3 vengono manipolati all'interno delle cappe biologiche. Tutti i materiali, previo trattamento per almeno 1 ora con soluzioni di ipoclorito di sodio del commercio, vengono posti in sacchetti e trasferiti in contenitori metallici da autoclavare a 121°C per 60 min mediante l'autoclave passante posta tra il laboratorio e l'anticamera. I contenitori vanno posti nell'autoclave previo accertamento dell'apertura delle ghiera di entrata del vapore e l'apposizione di un segmento di nastro termico, la cui variazione di colore dopo l'autoclavatura ne assicura l'avvenuta sterilizzazione.

Il laboratorio possiede un sistema di temporizzazione della fumigazione gassosa con formalina, da utilizzare non nella routine ma solo in caso di sversamento di materiale biologico od altro tipo di incidente. Questo in quanto la formalina è un gas pericoloso e irritante ed è sospetta di essere cancerogena (<http://www.niehs.nih.gov/odhsb/notes/note5.htm>). I pavimenti e le pareti sono in materiale plastico lavabile. Il laboratorio P3, così come le apparecchiature contenute al suo interno e l'autoclave passante, sono sottoposte a controllo periodici (ogni 6 mesi) della ventilazione e della funzionalità dei filtri, rotor ecc. da parte di ditte specializzate. Gli operatori del laboratorio P3 devono indossare indumenti monouso quali camici con apertura posteriore muniti di manicotti sfilabili di copertura dell'avambraccio, doppi guanti, calzari di copertura delle scarpe, mascherine tipo FFP<sub>2</sub> con efficienza del 95% per particelle di 0.3 um di diametro (TB respiratory protection program

in health care facilities, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 1999, <http://www.cdc.gov/niosh/99-143.html>, e Guidelines for prevention of tuberculosis in health care Facilities in resource-limited settings, WHO/TB/99.269). Tali accorgimenti sono particolarmente importanti per la manipolazione di ceppi di *M.tuberculosis* MDR (Multi-Drug Resistant). Dopo aver lavorato nel laboratorio P3, prima di uscire, si devono gettare via il primo paio di guanti e i manicotti per le braccia in un contenitore metallico per materiali autoclavabili, poi occorre andare nello spogliatoio e gettare via gli altri indumenti in un altro contenitore metallico. Quando quest'ultimo è pieno, va trasferito nel laboratorio e autoclavato tramite l'autoclave passante come di norma.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1376-1395.
2. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America. Treatment of Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 603-662.
3. Angarano G, Antinori A, Cauda R, Fattorini L, Moro ML, Orefici G, Ortona L. Tubercolosi, Epidemiologia, Diagnosi e Terapia (a cura di Antonio Cassone). Accademia Nazionale di Medicina. I Manuali. MD 35. 2000.
4. Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors and Centers for Disease Control and Prevention. *Mycobacterium tuberculosis: assessing your laboratory*. Washington DC. Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors, 1995.
5. CDC. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR* 1996; 45: 950-951.
6. CDC. Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR* 2000; 49: 593-594.
7. Cernoch PL, Enns RK, Saubolle MA, and Wallace RJ Jr. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the Mycobacterioses. AS Weissfeld Ed. American Society for Microbiology, Washington DC 1994.
8. Della-Latta P. The mycobacteriology milestones. *Lab Med* 1999; 30: 408-417.
9. Decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626.
10. Documento di linee-guida per il controllo della malattia tubercolare, su proposta del Ministro della sanità, ai sensi dell'art. 115, comma 1, lettera b), del decreto legislativo 31 marzo 1998, n.112. Provvedimento 17 dicembre 1998. Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 40 del 18 febbraio 1999.
11. Erbesole, LL. Acid-fast stain procedures. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 3.5.1-11.
12. Hacek D. Modified proportion agar dilution test for slowly growing mycobacteria. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 5.13.1-15.
13. Hale YM, Pfyffer GE, and Salfinger M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lesson learned. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 834-846.
14. Heifets L. Mycobacteriology laboratory. *Clin Chest Med* 1997; 18: 35-53.
15. Ieven M., and Goossens H. Relevance of acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 242-256.
16. Inderlied CB and Salfinger M. Antimycobacterial agents and susceptibility tests. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover FC Eds, Washington DC 1999; 1601-1623.
17. Kent PT, and Kubica GP. Specimen collection and transportation. In: *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. US Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta 1985; 21-30.
18. Little M., Andrews J., Moore R., Bustos S., Jones L., et al, Strand Displacement Amplification and Homogeneous Real-Time Detection Incorporated in a Second-Generation DNA Probe System, BDProbeTecET; *Clinical Chemistry*.1999; 45: 6, 777-784.
19. Mandler F, Passerini Tosi C, Scarparo C, Tortoli E, Piersimoni C e il Comitato AMCLI per studio dei micobatteri. Proposta di linee-guida per la diagnostica microbiologica della tubercolosi. *Microbiologia Medica* 1999; 14: 313-330.
20. Metchock BG, Nolte FS, and Wallace RJ Jr. Mycobacterium. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, and Tenover FC Eds, Washington DC 1999; 399-437.
21. NCCLS. Antimycobacterial susceptibility testing for Mycobacteria, Nocardia and other aerobic

- Actinomycetes; tentative standard-Second Edition. M24-T2. NCCLS Wayne Pa 2000.
22. Pfyffer GE, Bonato DA, Ebrahimzadeh A, et al. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using the radiometric Bactec 460 and the proportion method with solid media. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3179-86.
  23. Roberts GD, Hall L, and Wolk DM. Mycobacteria. In: Manual of commercial methods in clinical microbiology, Truant AL Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 2002; 256-273.
  24. Rüsç-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, and Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 45-8.
  25. Siddiqui SH. Primary isolation of mycobacteria: Bactec method. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 3.7.1-7.
  26. Siddiqui SH. Blood culture for mycobacteria: Bactec method. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 3.8.1-4.
  27. Siddiqui SH. Bactec NAP test. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 3.13.1-4.
  28. Siddiqui SH. Radiometric (Bactec) tests for slowly growing mycobacteria. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 5.14.1-13.
  29. Shinnick TM, and Good RC. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 291-299.
  30. Stockman L. Blood culture for mycobacteria: Isolator method. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 3.9.1-5.
  31. Stockman L. DNA Probes for identification of mycobacteria. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 3.15.1-4.
  32. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh Jr. CR, and Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31: 767-770.
  33. Wallis CK. Specimen collection and transport. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, Iseberg HD Ed, American Society for Microbiology, Washington DC 1992; 3.2.1-6.
  34. Watterson SA, and Drobniwsky FA. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. *J Clin Pathol* 2000; 53: 727-732.
  35. Woodley C L. Evaluation of streptomycin and ethambutol concentrations for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric and conventional procedures. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 385-386.