



MICOBATTERIOLOGIA CLINICA

ASSOCIAZIONE MICROBIOLOGI CLINICI ITALIANI, AMCLI
VIA CARLO FARINI 81, 20159 MILANO

COPYRIGHT 2013
AMCLI
TUTTI I DIRITTI RISERVATI

IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTO LIBRO È PROTETTO DA COPYRIGHT E NON PUÒ ESSERE RIPRODOTTO SOTTO QUALSIASI FORMA SENZA AUTORIZZAZIONE SCRITTA DELL'ASSOCIAZIONE MICROBIOLOGI CLINICI ITALIANI (AMCLI).

ENRICO TORTOLI, CLAUDIO PIERSIMONI
CLAUDIO SCARPARO, DANIELA MARIA CIRILLO
ELIANA FRIZZERA

MICOBATTERIOLOGIA CLINICA

CEA
Selecta
MEDICA

**«A Ferruccio Mandler, pioniere
della micobatteriologia in Italia»**

Si ringraziano i seguenti sponsor per il contributo fornito alla realizzazione della seconda edizione di *Micobatteriologia Clinica*:

Becton-Dickinson

Arrow Diagnostics

Arnika

Biomedical Service

Cepheid

ADA

bioMérieux

Abbott

Biolife

Si ringrazia il **dr. Walter Frizzera** per la consulenza informatica.

Realizzazione del CD allegato al libro a cura di Enrico Tortoli.

Revisione linguistica del testo a cura di Eliana Frizzera.

AUTRICI E AUTORI

GIOVANNI ALBORALI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

MARIA BEATRICE BONIOTTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

EMANUELE BORRONI

Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico S. Raffaele, Milano

ANDREA MAURIZIO CABIBBE

Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico S. Raffaele, Milano

PATRIZIA CHIARADONNA

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma

DANIELA MARIA CIRILLO

Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico S. Raffaele, Milano

LUIGI RUFFO CODECASA

Centro Regionale di Riferimento per la TBC, Azienda Ospedaliera Niguarda Cà Granda, Milano

LANFRANCO FATTORINI

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

ELIANA FRIZZERA

Centro Provinciale di Riferimento per la TBC, Ospedale Centrale S. Maurizio, Südtiroler Sanitätsbetrieb - Azienda Sanitaria dell'Alto Adige - Azienda Sanitaria de Sudtirolo, Bolzano

DANIELA GELMETTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

DANIELA MARCHETTI

Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Maggiore, Bologna

PAOLO MIOTTO

Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico S. Raffaele, Milano

GIAN LORENZO MOLINARI

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Novara

MARIA LODOVICA PACCIARINI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

FEDERICA PIANA

Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Santa Croce e Carle, Cuneo

CLAUDIO PIERSIMONI

Centro di Riferimento Regionale per la Diagnostica dei Micobatteri, Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona

RENATO RIVA

Gruppo di Lavoro Micobatteri AMCLI, Milano

CLAUDIO SCARPARO

Laboratorio di Microbiologia Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Maria della Misericordia, Udine

SILVIA TAGLIABUE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

ENRICO TORTOLI

Unità Patogeni Batterici Emergenti, Istituto Scientifico S. Raffaele, Milano

MIRELLA TRONCI

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma

MARIAGRAZIA ZANONI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia

INDICE

RINGRAZIAMENTI

AUTRICI E AUTORI

PREFAZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE		XI
PREFAZIONE ALLA SECONDA EDIZIONE		XIII
INTRODUZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE		XV
INTRODUZIONE ALLA SECONDA EDIZIONE		XVII
CAPITOLO 1	LA STORIA DELLA TUBERCOLOSI <i>Eliana Frizzera</i>	I
CAPITOLO 2	GENERALITÀ SUI MICOBATTERI <i>Enrico Tortoli</i>	51
CAPITOLO 3	LA TUBERCOLOSI <i>Claudio Scarparo, Luigi Ruffo Codecasa, Eliana Frizzera</i>	61
CAPITOLO 4	LE INFEZIONI DA MICOBATTERI NON TUBERCOLARI <i>Enrico Tortoli, Claudio Piersimoni</i>	87
CAPITOLO 5	RACCOLTA, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI <i>Claudio Piersimoni</i>	123
CAPITOLO 6	ESAME MICROSCOPICO <i>Gian Lorenzo Molinari</i>	139
CAPITOLO 7	DECONTAMINAZIONE E COLTURA <i>Patrizia Chiaradonna, Mirella Tronci</i>	153
CAPITOLO 8	IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI <i>Enrico Tortoli</i>	185
CAPITOLO 9	TEST DI SENSIBILITÀ <i>Claudio Scarparo, Lanfranco Fattorini</i>	211
CAPITOLO 10	DETERMINAZIONE MOLECOLARE DELLA FARMACO-RESISTENZA <i>Daniela Maria Cirillo, Paolo Miotto, Andrea Maurizio Cabibbe</i>	239

CAPITOLO 11	RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> COMPLEX DA CAMPIONI CLINICI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE GENICA Claudio Piersimoni	261
CAPITOLO 12	EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLA TUBERCOLOSI Daniela Maria Cirillo, Paolo Miotto, Emanuele Borroni	287
CAPITOLO 13	LA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE Daniela Maria Cirillo, Federica Piana, Daniela Marchetti	319
CAPITOLO 14	LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA Claudio Scarparo, Renato Riva	337
CAPITOLO 15	ORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI MICOBATTERIOLOGIA Claudio Scarparo	353
CAPITOLO 16	LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI BOVINA NEI LABORATORI VETERINARI Maria Lodovica Pacciarini, Mariagrazia Zanoni, Daniela Gelmetti, Maria Beatrice Boniotti, Silvia Tagliabue, Giovanni Alborali, Claudio Piersimoni	367
CAPITOLO 17	ELEMENTI ESSENZIALI DI MICOBATTERIOLOGIA AD USO CLINICO Claudio Scarparo, Enrico Tortoli	383
ATLANTE FOTOGRAFICO		409
INDICE ANALITICO		419

PREFAZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE

Ferruccio Mandler

Micobatteriologia Clinica rappresenta una pietra miliare nello studio delle infezioni da micobatteri, non solo per quanto attiene agli aspetti microbiologici, ma anche per aver saputo condensare le più importanti conoscenze epidemiologiche, cliniche e di sanità pubblica ad esse correlate.

La tubercolosi che oggi, accanto all'AIDS e alla malaria, è una delle malattie più diffuse, va conosciuta da tutti, specie da coloro che, operando in Sanità nei Paesi ove questa è poco diffusa, l'hanno dimenticata; in tali Paesi è infatti in continuo aumento il numero delle persone provenienti da aree in cui la tubercolosi è ancora endemica.

Redatto da noti studiosi nazionali con esperienza pluriennale sul campo, conosciuti anche a livello internazionale per le pubblicazioni su autorevoli riviste, nonché per i prestigiosi incarichi ufficiali in società scientifiche e nell'ambito dell'OMS, il manuale conduce il lettore in una *full immersion* nel variegato universo della micobatteriologia.

Diversamente da quanto si fa usualmente, libri di clinica dedicati ai clinici, libri di microbiologia dedicati ai microbiologi, questo libro pone le basi per una proficua collaborazione interdisciplinare, presupposto imprescindibile per la lotta alla malattia tubercolare.

Nel presentare il volume abbiamo la consapevolezza che questo resterà per molti anni il testo di riferimento a cui gli operatori nazionali si rivolgeranno nell'esercizio delle quotidiane attività tecnico-assistenziali.

Nel nostro Paese mancava un testo simile. Esso si affianca alle note guide tecniche e operative esistenti, promosse dalle più qualificate Società Scientifiche Americane ed Europee. Ci si augura che oltrepassi la frontiera della lingua italiana e che possa diffondersi in altre latitudini.

Redatto da Enrico Tortoli, Claudio Piersimoni, Claudio Scarparo e Daniela Maria Cirillo, in collaborazione con altri validi Autori e Autrici, sarà certamente apprezzato dalla comunità scientifica e potrà costituire una base tecnico-culturale per l'elaborazione, anche a livello politico, di un'efficace strategia per sconfiggere la tubercolosi.

PREFAZIONE ALLA SECONDA EDIZIONE

Enrico Magliano

Direttore Scientifico

Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI)

Per anni, quando mi si presentava un problema complesso o nuovo di micobatteriologia telefonavo per consulto al Prof. Mandler... e non ero il solo!

L'amico Ferruccio era sempre esauriente ed aggiornato; un microbiologo dotato di una visione interdisciplinare dei problemi che lui stesso considerava imprescindibile per lo sviluppo e la visibilità della nostra professione.

Ferruccio ci ha lasciati e sono sicuro di rappresentare l'AMCLI ricordandolo in occasione della presentazione della seconda edizione di *Micobatteriologia Clinica*, opera di validi, riconosciuti e appassionati Autori e Autrici, da lui fortemente voluta e che sono sicuro continuerà ad essere un testo di riferimento per tutti i Microbiologi Italiani.

Infine, è per me motivo di soddisfazione constatare che questa monografia costituisce un importante momento di sinergia fra una grande associazione come la nostra e una casa editrice di consolidata tradizione nel campo dell'editoria scientifica quale CEA-Selecta Medica.

INTRODUZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE

Enrico Tortoli, Claudio Piersimoni, Claudio Scarparo, Daniela Maria Cirillo

Le infezioni da micobatteri hanno afflitto il genere umano sin dagli albori della civiltà. La tubercolosi, già responsabile di tassi di morbosità e mortalità spaventosi nei Paesi in via di sviluppo, è tornata a far parlare di sé, nei Paesi industrializzati, la stampa non specializzata, i media radiotelevisivi e la rete. Le resistenze, un tempo rare, sono in progressivo aumento e, coinvolgendo più farmaci, pongono nuovi seri problemi terapeutici, tantoché torna a profilarsi all'orizzonte lo spettro della tubercolosi incurabile. Non si può ignorare nemmeno il ruolo delle infezioni da micobatteri non tubercolari che colpiscono non solo pazienti gravemente immunodepressi, ma anche soggetti affetti da deficit locali dell'immunità o addirittura immunocompetenti. Grazie all'applicazione su larga scala dei metodi di biologia molecolare, le specie di micobatteri riconosciute, che erano negli anni '70 appena una trentina, sono attualmente oltre 120. È intuibile dunque come il laboratorio di microbiologia giochi un ruolo chiave nel controllo delle infezioni da micobatteri: una diagnosi rapida e accurata di tubercolosi è di fondamentale importanza in vista di un precoce trattamento farmacologico e di una tempestiva applicazione delle misure di contenimento, mentre la corretta identificazione dei micobatteri non tubercolari pone seri problemi superabili solo con un' incisiva riorganizzazione dell'attività dei laboratori.

In analogia alla precedente edizione di *Micobatteriologia Clinica*, pubblicata dal Comitato AMCLI per lo Studio dei Micobatteri nel 1999, il presente aggiornamento intende fornire a quanti lavorano in ambito microbiologico il supporto conoscitivo indispensabile per avvicinarsi alla diagnostica micobatteriológica. Accanto alle metodiche inerenti ciascuna fase lavorativa, preanalitica, decontaminazione, esame microscopico, amplificazione diretta da campione clinico, coltura, identificazione e test di sensibilità (tradizionale e a livello genotipico), vengono affrontati anche gli aspetti relativi all'epidemiologia molecolare, alla diagnosi dell'infezione tubercolare latente, alla sicurezza e all'organizzazione dei laboratori. Vi sono anche indicazioni, mutuata dalla medicina basata sulle evidenze, riguardo a un utilizzo *cost-effective* delle indagini microbiologiche che rispetti comunque l'appropriatezza diagnostica. Abbiamo inoltre ritenuto utile far precedere a quanto sopra una sezione di inquadramento della tubercolosi e delle patologie da micobatteri non tubercolari. Un intero capitolo è stato dedicato ai colleghi clinici, sia per superare i più frequenti motivi di incomprensione sia per porre le basi di un linguaggio comune che porti a un reale vantaggio per il paziente, fine ultimo del nostro lavoro.

Non pretendendo di trattare la micobatteriologia in maniera esaustiva, ci siamo limitati ad approfondirne gli aspetti essenziali di maggior interesse in un Paese industrializzato come il nostro.

Ci auguriamo infine che, analogamente a quanto accaduto in occasione della precedente edizione, utilizzata dal Ministero della Salute per la pubblicazione del *Manuale tecnico per la diagnosi microbiologica delle tubercolosi* del febbraio 2004 sotto forma di Lettera Circolare, anche *Micobatteriologia Clinica* sia propedeutica alla stesura delle nuove linee guida nazionali nonché alla preparazione di linee guida regionali.

INTRODUZIONE ALLA SECONDA EDIZIONE

**Enrico Tortoli, Claudio Piersimoni, Claudio Scarparo, Daniela Maria Cirillo
ed Eliana Frizzera**

Pubblichiamo la seconda edizione di *Micobatteriologia Clinica* a quattro anni di distanza dalla prima.

In questo periodo ci sono pervenute numerose attestazioni di gradimento da parte di colleghi/e operanti in varie zone del Paese. Abbiamo perciò pensato di conservare l'impianto generale del libro aggiornando i singoli capitoli. Fra gli argomenti in indice, la biologia molecolare (capitoli 10, 11 e 12) ha subito la revisione più ampia, ma anche l'infezione tubercolare latente, l'identificazione dei micobatteri e la preanalitica sono state riviste in maniera significativa. Inoltre, sono stati aggiunti due nuovi capitoli dedicati alla storia della tubercolosi e agli aspetti veterinari della malattia tubercolare.

Speriamo, infine, che questa nostra fatica possa essere di aiuto e di supporto a coloro che si occupano di Micobatteriologia quanto lo è stata la prima. Infine, un sentito ringraziamento è rivolto a coloro che hanno contribuito alla riuscita dell'opera e agli sponsor che ci hanno sostenuto nonostante la recessione che affligge il nostro Paese.

Capitolo I

LA STORIA DELLA TUBERCOLOSI

Eliaana Frizzera

1. LA STORIA DELLA TUBERCOLOSI

Tubercolosi come destino

Erich Ebstein, 1932

La tubercolosi o, con il suo remoto nome greco, tisi: malattia antica, malattia moderna.

Antica, originata ai primordi dell'umanità, che si stima avere provocato più morte di ogni altra malattia infettiva.

Moderna, non ancora sconfitta, ha accompagnato la vita di innumerevoli uomini e donne, influenzando il modo di intendere la propria esistenza e ispirando letteratura, poesia, pittura, musica, teatro, architettura ed estetica.

Mycobacterium tuberculosis, uno dei patogeni di maggior successo nella storia dell'evoluzione, capace di tenace sopravvivenza all'interno del genere umano.

1.1. L'ORIGINE

Storia affascinante, che si ipotizza iniziata tre milioni di anni fa, in tempi preistorici, nel cuore dell'Africa centro-orientale, quando il progenitore ancestrale di *Mycobacterium tuberculosis* avrebbe infettato le/i primi ominidi e altri primati. Tubercolosi, malattia più antica dunque della peste, del tifo, della malaria (37).

Molto più avanti nel tempo, appena 35.000-15.000 anni fa, si sarebbero differenziate le specie del *Mycobacterium tuberculosis* complex attualmente conosciute, evolutesi dal comune progenitore africano probabilmente correlato strettamente a "*Mycobacterium canetti*", mentre le moderne famiglie di *Mycobacterium tuberculosis* circolanti ora nel mondo, raggruppate in 6 cladi principali, avrebbero avuto origine soltanto in tempi ancora più recenti, tra i 250 e 1000 anni fa. Il genere *Mycobacterium*, invece, sembra molto più antico: è stata ipotizzata la presenza di *Mycobacterium ulcerans* già 150 milioni di anni fa nel periodo giurassico, ai tempi dei dinosauri (17).

Africa orientale dunque: casa ancestrale del bacillo della tubercolosi e culla dell'umanità. Da qui, circa 1,7 milioni di anni fa, le/i primi ominidi avrebbero iniziato a migrare – in ondate più massicce 25.000-90.000 anni fa – portando il bacillo tubercolare in Europa e in Asia e, con maggior difficoltà, nelle Americhe, attraverso lo stretto di Bering che presentava nelle ere glaciali del Pleistocene un ponte di terra (Beringia) tra Siberia e Alaska. Insediamenti umani in Cile sarebbero documentati, infatti, già 33.000 anni fa (17, 80).

1.2. SULLE TRACCE DELLA MALATTIA

Nella preistoria, quel periodo dell'umanità precedente a qualsiasi documentazione scritta, tracce di tubercolosi possono essere ricercate solo in resti umani, ossei o mummificati, e/o in raffigurazioni pittoriche e scultoree.

Segno tipico di tubercolosi ossea (morbo di Pott) viene considerata in primo luogo la defor-

mazione del tratto toraco-lombare della colonna conseguente alla distruzione di uno o più corpi vertebrali. I primi studi di paleopatologia risalgono appena al XIX secolo. Negli studi archeologici si cominciarono ad utilizzare, all'inizio del Novecento, le moderne tecniche istologiche, ricercando granulomi e bacilli alcol-acido-resistenti nei tessuti mummificati opportunamente reidratati, avvalendosi in tempi molto più recenti anche del microscopio elettronico. Le metodiche radiologiche, in origine la radiografia classica e successivamente la tomografia assiale computerizzata, hanno un limite importante rappresentato dall'alto carico di radiazioni che può alterare il DNA del micobatterio, precludendone studi genetici (22).

La nascita della paleomicrobiologia, basata sulla ricerca di *ancient DNA* (aDNA) con metodiche molecolari ha rappresentato una vera e propria rivoluzione. Il bacillo tubercolare è il candidato ideale per tali studi, ha infatti una parete resistente che agevola la preservazione del DNA; il DNA è ricco di guanina e citosina, che formano legami assai stabili; è presente solo in soggetti con infezione e spesso in sede di lesione. È proprio il bacillo tubercolare il primo patogeno di cui sia stato rilevato aDNA (in particolare la sequenza di inserzione IS6110): in resti ossei, nel 1993, e in tessuti mummificati, l'anno successivo. Altre metodiche molecolari, come lo *Spoligotyping*, si sono rivelate particolarmente utili, specie in caso di frammentazione del DNA, in quanto anche corte sequenze di appena 55-60 pb possono essere utili. Tecniche cromatografiche mirate alla ricerca degli acidi micolici e dei micocerosati della parete batterica rappresentano un valido ausilio nella conferma della presenza del bacillo tubercolare (22).

1.3. REPERTI PALEOPATOLOGICI

I primi studi, degli inizi del Novecento, segnalano la presenza di alterazioni morfologiche compatibili con tubercolosi, specialmente il morbo di Pott, nelle mummie dell'antico Egitto, più di 5000 anni fa. Uno dei reperti più famosi è la mummia del sacerdote di Ammon, Nesperehan, della XXI dinastia (1000 a.C.) con tubercolosi del rachide e ascesso del muscolo psoas (13). Nell'iconografia risalente all'antico Egitto non mancano immagini di soggetti con cifosi e cifoscoliosi alta correlabili al morbo di Pott; anche se non può essere del tutto escluso che tali deformità fossero mere convenzioni stilistiche dell'arte del tempo, è interessante come esse siano angolari, a differenza, ad esempio, di quelle lisce e rotondeggianti ritrovate nell'arte precolombiana (29). Tra le immagini più suggestive, due figurine in legno del periodo predinastico (Museo Reale di Arte e Storia, Bruxelles); il giardiniere gobbo dipinto su un murale dalla tomba di Ipy a Tebe, del XIX secolo a.C. (Metropolitan Museum of Art, New York); la statuetta di un uomo accovacciato affetto da una cifosi angolare, ritrovata nel deserto di Assouan e risalente al periodo predinastico (fig. 1.1); l'arpista disegnato su un *ostrakon* trovato a Deir-el-Bahari (Metropolitan Museum of Art, New York) (82). Tra i primi studiosi di tubercolosi egizia sono da segnalare Sir Marc Armand Ruffer (1858-1917), patologo, considerato uno dei padri fondatori della paleopatologia, Elliot Schimdt e AJE Cave (17, 68, 69).

Segni morfologici di tubercolosi, confermata in tempi più recenti dalla presenza di aDNA, sono stati trovati in mummie peruviane e sono raffigurati in reperti artistici di era precolombiana. In tessuti di una mummia ritrovata nelle Ande (200-800 d.C.) è stato possibile osservare tipiche lesioni granulomatose e bacilli alcol-acido-resistenti. Morfologie suggestive di tubercolosi sono state con-

Fig. 1.1 - STATUETTA DEL PERIODO PREDINASTICO, RITROVATA NEL DESERTO DI ASSOUAN, RAFFIGURANTE UN UOMO CON CIFOSI DORSALE.

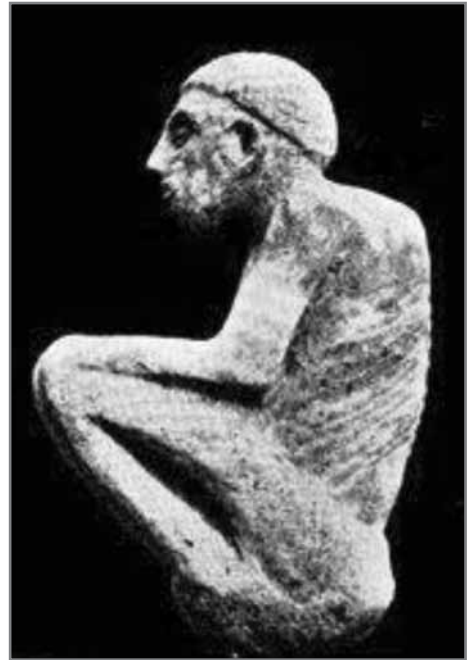
fermate dal reperto di *a*DNA e di lipidi specifici della parete micobatterica; *a*DNA è stato trovato anche in tessuti mummificati e ossei privi di lesioni macroscopiche e interpretato come conseguente a diffusione ematogena del germe (21, 22, 23).

L'avvento della paleomicrobiologia ha dato un fondamentale apporto alle nostre conoscenze; è appurato, ormai, che la tubercolosi è un'antica malattia, distribuita in tutto il mondo, largamente presente nell'antico Egitto e a Roma, esistente in Cina più di 2000 anni fa, nel Borneo prima del contatto con le/gli Europee/i, in America prima dell'avvento di Colombo (21, 23, 24).

Una delle poche dimostrazioni di tubercolosi umana attribuibile a una specie diversa da *Mycobacterium tuberculosis* è emersa dagli scavi del complesso tombale di Tebe ovest (Alto Egitto), databile in un periodo di tempo compreso tra il Medio Regno (2050 a.C.) e l'Età tarda (500 a.C.). Mummie ritrovate in una tomba del Medio Regno (2050-1650 a.C.) presentano lo spoligotipo specifico di *Mycobacterium africanum*, mentre campioni provenienti da mummie più recenti hanno il pattern tipico di *Mycobacterium tuberculosis* (81). L'unica evidenza di *a*DNA di *Mycobacterium bovis* in resti umani è stata trovata nel sito archeologico del cimitero di Aymyrlyg, nel sud della Siberia, su ossa con segni morfologici di tubercolosi (morbo di Pott), attribuite a persone dedite alla pastorizia vissute all'età del ferro (360-230 a.C.) (75).

Resti paleopatologici suggestivi di tubercolosi in animali sono piuttosto rari, fatta eccezione per quelli rinvenuti nella Natural Trap Cave (Wyoming, USA), fossa profonda 30 metri in cui sono rimaste intrappolate diverse specie animali per più di 100.000 anni. Dalle ossa metacarpali di un bisonte estinto del pleistocene, risalente a circa 17.500 anni fa, si è potuto rilevare *a*DNA di *Mycobacterium tuberculosis* complex. Si tratta del più antico reperto animale con lesioni tubercolari confermate da metodiche molecolari (21).

Le più remote tracce di tubercolosi umana confermata da *a*DNA, invece, risalgono al periodo neolitico. Nei siti preistorici della Liguria, sono stati ritrovati due scheletri, di una donna e di un adolescente affetti da spondilodiscite tubercolare (10). Un'altra segnalazione di tubercolosi, risalente allo stesso periodo (3200-2300 a.C.) e confermata dalla presenza di *a*DNA, viene dalla Svezia, associata ai primi allevatori di bestiame (24). Bacilli alcol-acido-resistenti sono stati evidenziati inoltre in una vertebra di uno scheletro umano risalente al periodo neolitico (5000 a.C.), ritrovato ad Heidelberg, Germania (40). Nel sito archeologico del villaggio neolitico di Atlit-Yam, nei pressi di Haifa (Israele), rimasto sommerso dal mare per migliaia di anni e risalente a circa 9000 anni fa, si



sono rinvenuti recentemente resti ossei di una giovane donna e di un bambino, che presentavano segni suggestivi di tubercolosi, in cui è stata rilevata la presenza di *aDNA*, con spoligotipo indicativo di *Mycobacterium tuberculosis*, e di acidi micolici specifici. Tale reperto costituisce attualmente il più antico caso di tubercolosi umana confermata da metodiche di biologia molecolare (39). L'evidenza di *Mycobacterium tuberculosis* e l'assenza di *Mycobacterium bovis* in uno dei primi villaggi neolitici che praticavano la domesticazione animale contrasta con la teoria, ormai superata, che voleva la tubercolosi umana derivare da quella bovina – al momento del passaggio, proprio nel neolitico, da un'economia nomade basata sulla caccia e la raccolta a un'economia stanziale fondata sull'agricoltura e l'allevamento di bestiame. La presenza di lesioni compatibili con meningite tubercolare nella superficie endocranica di un osso frontale di *Homo erectus*, risalente a circa 500.000 anni fa e ritrovato in Turchia occidentale, deporrebbe per una lunga coesistenza di bacillo tubercolare e ospite (43). Alcuni studiosi, tuttavia, ritengono che l'attribuzione dell'impronta ossea alla patologia tubercolare non sia suffragata da esaurienti prove scientifiche (64).

1.4. I POPOLI ANTICHI

Lo straordinario evento dell'invenzione della scrittura e la decifrazione dei suoi caratteri arcaici hanno permesso di approfondire le conoscenze relative alla tubercolosi nei tempi antichi.

Anche se nell'antichità la tubercolosi non era un'entità nosologica ben definita (aveva nomi diversi e comprendeva un insieme di patologie non ben identificate), numerose sono tuttavia le descrizioni che ragionevolmente possono far pensare che ad essa ci si riferisse. L'arte medica era appannaggio delle classi sacerdotali e non vi era netta distinzione tra religione e medicina. La malattia, soprattutto quella cronica, era considerata un castigo divino: per questo non deve stupire che molti riferimenti alla tubercolosi siano presenti in testi sacri e i rimedi consigliati consistano spesso in offerte votive (49).

Nei *Veda* (in sanscrito, scienza), grandiosa raccolta di scritti di carattere religioso dell'antica cultura indiana (3000-1500 a.C.), sono descritti sintomi compatibili con la tubercolosi, considerata "impura", tantoché i bramini avevano il divieto di sposarsi con membri di famiglie tistiche. Era ritenuta, nello *Yajurveda*, malattia di enorme gravità, difficilmente guaribile se non in fasi precoci, tanto che la fama di grande medico veniva attribuita soltanto a chi si fosse dimostrato capace di curarla. Nello *Susruta* veniva descritta come "malattia reale" caratterizzata da undici sintomi, la presenza di alcuni dei quali, febbre ed emottisi, rendeva la prognosi talmente negativa tale da rendere inutile ogni terapia. Le indicazioni terapeutiche rivestivano carattere ora magico-sacerdotale, ora empirico; fra i consigli, aspersioni, moto fisico moderato, dieta carnea e latte, depurazione con purganti ed emetici, aglio come antitermico ed essenza di pino come anticatarrale, evitare collera, invidia, dispiaceri (50).

Sembra che il popolo cinese avesse descritto la tubercolosi già 2700 anni a.C., ai tempi dell'imperatore Chin-Hong, padre della medicina cinese; fondamentale il *Canone della medicina* dell'imperatore Huang Ti (29). Nell'antica filosofia cinese, base della medicina tradizionale, si riteneva che all'origine del mondo si fossero differenziati due principi opposti: lo *yang*, maschile, caldo e attivo e lo *yin*, femminile, freddo e passivo. Le malattie dovute allo *yang* erano considerate facili da curare,

quelle dovute allo *yin* difficili. “La tubercolosi è una malattia dello *yin*, è la numero uno delle malattie incurabili”, scriveva ancora, secoli dopo, Goto Konzan (1659-1733), uno dei più importanti dottori della Scuola di antica medicina (78). La prognosi era dedotta dall'esame del polso, altro cardine della medicina cinese antica; se il polso era forte, la/il paziente, considerato incurabile, veniva privato di ogni cura (32). Di ispirazione prevalentemente magica i rimedi, scongiuri, preghiere, offerte e l'assunzione di carne di corvo o di particolari cibi talora ripugnanti (50).

In Mesopotamia, regione dell'Asia tra i fiumi Tigri ed Eufrate, si sviluppò, tra il IV e il I millennio a.C., una straordinaria civiltà. Il *Codice babilonese* di Hammurabi, inciso in caratteri cuneiformi tra il 1948 e il 1905 a.C. su tavolette di diorite, è fra le più antiche raccolte di leggi (fig. 1.2). Circa un terzo di esso è dedicato all'arte medica; vi si trovano riferimenti a una malattia cronica polmonare, presumibilmente la tubercolosi (“... il malato tossisce frequentemente... il suo escreato è denso, talvolta striato di sangue...”) (40).

Contemporanea alla civiltà mesopotamica, quella egizia. Nei papiri medici egizi, che coprono circa due millenni, a cui si aggiungono scritti arcaici risalenti ad epoche precedenti, non vi è nessun sicuro riferimento alla tubercolosi; tuttavia, in alcuni sono descritti sintomi compatibili, come tosse, adeniti cervicali, ascessi freddi. Vi sono inoltre indicazioni di numerosi rimedi per la tosse, quali carrube, miele, datteri e trifoglio dolce, fumigazioni, nonché di un'alimentazione ricca e diversa da quella normale. Che la tosse potesse portare a morte è testimoniato da un testo funerario risalente al Periodo Tardo (664-332 a.C.) presente su un edificio della necropoli di Tuna el Gebel: “... la morte, giunta con l'aiuto di un colpo di tosse...” (82).

La tisi è indicata in ebraico con il nome *schachepheth* (consunzione). Tale termine, riferito alla tubercolosi anche nella lingua ebraica moderna, è utilizzato nella *Bibbia*, nel Deuteronomio (28:22 “Il Signore ti colpirà con la consunzione, con la febbre, con l'infiammazione, con l'arsura, con la siccità, il carbonchio e la ruggine, che ti perseguiteranno finché tu non sia perito”) e nel Levitico (26:16 “Ecco che cosa farò a voi a mia volta: manderò contro di voi il terrore, la consunzione e la febbre, che vi faranno languire gli occhi e vi consumeranno la vita), i cui testi erano tramandati oralmente fin dai tempi in cui il popolo ebraico viveva esule nell'antico Egitto (18). Si riteneva, in passato, che la comunità ebraica avesse sviluppato un'immunità alla tubercolosi più forte di ogni altro popolo, forse perché la *Bibbia* contiene numerosi riferimenti alla natura infettiva di varie malattie e consiglia l'adozione



Fig. 1.2 - STELE CON IL CODICE DI HAMMURABI.

di rigide precauzioni igieniche (distruzione degli abiti e delle abitazioni); alcune sono espressamente riferite alla lebbra, ma non è improbabile che fossero adottate anche nei confronti della tisi (59, 79).

1.5. LA TISI

Nella civiltà greca, la medicina preippocratica considerava le malattie croniche come punizioni divine e il soggetto malato era socialmente stigmatizzato come peccatore, non veniva curato e perdeva la sua funzione nell'ambito della comunità, in contrasto con le patologie traumatiche che, specialmente se di origine bellica, avevano una valenza eroica. Sia nell'*Iliade* che nell'*Odissea* viene utilizzato il termine *phthimo* che significa “consumarsi”, per definire una malattia a lunga durata con progressiva perdita di forze. È in Erodoto (circa 480/490-425 a.C.) che viene impiegato per la prima volta il termine *phthisis*, per descrivere una patologia cronica di un guerriero che, cadendo da cavallo, aveva emesso sangue dalla bocca; non vi è tuttavia alcun indizio che si riferisse alla tubercolosi (76).

Con Ippocrate (circa 460-370 a.C.), la medicina, di cui è ritenuto universalmente il fondatore, per la prima volta assume i connotati di scienza. Nel *Corpus Hyppocraticum*, redatto durante l'epoca ellenistica, vengono usati i termini *phthisis* e *phthoe*, che diverranno in tedesco *Schwindsucht* o *Phthisis*, in anglosassone *consumption*, in francese *phthisie*, in italiano *tisi* o *etisia*, nomenclatura usata per secoli, nel mondo occidentale, fino all'introduzione della moderna dizione “tubercolosi”. Etimologicamente il termine *phthisis* deriva dal verbo *phthimio*, che significa “svanire, affievolirsi, consumarsi”, probabilmente imparentato con *phtheiro* (andare in rovina, deteriorarsi) tramite la radice *phthi*, di origine non chiara. Il participio passato *phthimeno*i significa “i morti, i trapassati, gli scomparsi” oppure “l'affievolirsi delle forze che porta a morte”, la forma transitiva significa “uccidere, annientare, scompaginare”. La parola *phthisis*, “*decrementum, consumptio*” in latino, veniva usata per esprimere il declinare di ordinari fenomeni naturali, come il finire del mese, il tramontare del sole, l'ultimo quarto lunare. In Ippocrate il termine “tisi” si delinea, assumendo per la prima volta la precisa connotazione di malattia cronica a localizzazione pleuropolmonare, a differenza degli scritti preippocratici in cui veniva utilizzato, in modo più generico, per indicare una qualsivoglia malattia a lento decorso. La tisi era descritta come la più grande di tutte le malattie, la più difficile da curare e la sola fatale; colpiva tra i 18 e i 35 anni, con una durata media di circa 7-9 anni ed esito spesso letale; la sintomatologia si aggravava durante l'inverno. Ai medici era raccomandato di evitare di visitare le/i malati in fase terminale, l'unico effetto sarebbe stato, infatti, quello di danneggiare la propria reputazione (76). Come terapia venivano prescritti la radice starnutatoria (elleboro), infusi di lenticchie, un'alimentazione quanto più ricca possibile, specialmente di latte, di carne di maiale, di manzo e di pecora, l'astensione da cibi piccanti, l'induzione di vomito dopo il pasto, una modica ginnastica, passeggiate, l'astinenza dai rapporti sessuali (26, 79). Alle persone ammalate venivano consigliati soggiorni in località marine o visite ai templi degli dèi e delle dee, in particolare quelli localizzati in aree salubri. Per primo, inoltre, Ippocrate intuì che le lesioni della colonna vertebrale e quelle polmonari avevano una patogenesi comune (31).

Platone (circa 428- 347 a.C.), medico oltre che filosofo, in modo molto pragmatico reputava che gli interventi terapeutici non fossero di alcun vantaggio, né per lo Stato, né per la/il paziente; nella maggior parte dei casi il destino era comunque la morte (31).

La natura contagiosa della malattia era già sospettata da Aristotele (384-322 a.C.), che affermava: "La malattia si contrae nelle vicinanze dei malati, in quanto c'è in questa aria pernicioso, qualcosa che produce malattia". La maggior parte dei medici greci, compreso Ippocrate, la riteneva invece ereditaria, e individuava nella debolezza, mentale e morale, un fattore predisponente. Aristotele, inoltre, aveva già osservato lesioni tubercolari nel bestiame (59).

Nella Roma imperiale, Areteo di Cappadocia, medico greco vissuto tra il I e il II secolo d.C., che praticava a Roma e ad Alessandria, introdusse il concetto di "empiema pleurico", che differenziò dalla tisi polmonare, affermando che la pleura era molto più suscettibile alla malattia rispetto al polmone. I Romani non solo erano consci della natura contagiosa della tubercolosi, ma avevano osservato anche che la malattia poteva recidivare e talvolta guarire. Era raccomandato, a tale scopo, un lungo viaggio in località marine, calde e asciutte, in particolare in Sicilia o in Egitto; Cicerone stesso (107-44 a.C.), gravemente ammalato, avrebbe intrapreso un viaggio in Grecia, a Rodi e in Asia nell'80 a.C. e ne sarebbe ritornato guarito. Gli antichi Romani, inoltre, seguendo la tradizione greca, davano molta importanza a una nutrizione variata e abbondante e alla idroterapia. Caio Plinio, detto il Vecchio, (23-79 d.C.), autore dell'opera *Naturalis Historia*, riteneva che il sole fosse il più grande dei rimedi "*Sol est remediorum maximum*", raccomandava le pinete per il loro potere di guarigione e l'assunzione di fegato di lupo bollito nel vino e di sangue di elefante (79).

L'arrivo a Roma di Galeno (131-200 d.C.), massimo esponente della scienza medica greca dopo Ippocrate, inaugurò una nuova epoca basata sull'osservazione e sul metodo sperimentale e segnò il punto culminante della medicina greco-romana. Galeno riteneva la tubercolosi contagiosa e incurabile, erano proibiti le/i visitatori, anche se familiari; per la febbre si prescriveva di risiedere in ambienti freschi, ben ventilati. Grande importanza era data alla somministrazione di latte fresco, tanto che venivano portate nella stanza delle persone malate direttamente una donna o un'asina. Erano prescritti anche viaggi in montagna, ad alta quota (79). Galeno e Areteo fecero, inoltre, un'importante distinzione nosologica tra *phthisis*, decadimento o consunzione, e *phthoe*, consunzione derivante da ulcere (59).

Nel periodo post-galenico i medici seguirono scrupolosamente gli insegnamenti classici; non mancarono, anche in questo periodo, uomini di talento. Celio Aureliano, uno dei più importanti medici romani, vissuto nel V secolo d.C., autore del trattato *De morbis acutis e chronicis*, descrisse magistralmente la tubercolosi: "... la voce è rauca od acuta, il respiro faticoso, le guance arrossate in contrasto al resto del corpo di colore cinerino, lo sguardo esausto, ed il paziente è emaciato..." (40, 79).

La malattia nell'antichità era particolarmente diffusa nelle città, greche e romane, ad alta densità di popolazione. Più tardi, con la caduta dell'Impero Romano d'Occidente, la decentralizzazione della popolazione verso l'Europa occidentale e lo sviluppo di economie agricole separate portò a una diminuzione dell'incidenza della malattia (79).

1.6. LA MEDICINA ARABA

Gli studiosi arabo-islamici ripresero, nel Medioevo, le nozioni dei classici greci, facendo un lavoro di rielaborazione, verifica logica e riclassificazione di estrema precisione. Poiché molti Autori

(tra questi Rhazes, Albucasis, Avicenna, Ali Abas) vennero tradotti in latino e in ebraico e diffusi nel mondo allora conosciuto, il loro contributo allo sviluppo della scienza medica fu veramente notevole. Nacquero proprio nell'ambito della medicina arabo-islamica i primi tisiologi, medici dedicati completamente allo studio e alla cura della tubercolosi. Al-Majousi descrisse la presenza di dita a bacchetta di tamburo nei pazienti tubercolotici. Abu-Ali Al-Husain Ibn-Sina, conosciuto con il nome latinizzato Avicenna (980-1037), fu autore del trattato *Canone*, capolavoro della sistematica medica, che costituì il basamento dei corsi universitari di medicina in tutta Europa, tra il 1250 e il 1600. A lui si devono eccellenti descrizioni della sintomatologia, degli stadi anatomico-patologici, delle localizzazioni e dei fattori predisponenti della tubercolosi (torace stretto, corpo sottile, età tra i 18 e i 30 anni). Riteneva la malattia contagiosa, ma curabile e consigliava terapia climatologica e assunzione di latte fresco (13, 48).

Ippocrate, Galeno e Avicenna sono i soli medici ad avere l'onore di essere posti da Dante nel Limbo fra gli "uomini valenti, non battezzati", a conferma dell'alta considerazione di cui godevano i loro studi a distanza di molti secoli (fig. 1.3) (13).



Fig. 1.3 - GALENO, AVICENNA E IPPOCRATE, AUTOREVOLI STUDIOSI DELLA TISI.

1.7. LE CAPSULE EBURNEE

Nel Medioevo, il progresso scientifico segnò il passo; fra le cause, fattori culturali, religiosi, filosofici ed economici. Vi fu una tendenza a considerare le infermità come un castigo di Dio per i peccati commessi, probabilmente anche a causa dell'impotenza della medicina nei confronti delle malattie; era comune convinzione che la conoscenza non fosse raggiungibile attraverso la ragione o i sensi, ma solo con l'ascesi o l'intima comunione dello spirito con Dio (49).

Gli scritti medici del tempo erano chiamati "capsule eburnee", a voler significare che erano il risultato della rivelazione, fatta da Dio agli Autori, della presenza, sulla una vetta di un monte, di una cassetta di avorio contenente il segreto dei segreti per la cura di ogni malanno. Nella biblioteca di Montecassino è conservato un *Codice* risalente alla fine del secolo IX o al principio del X, contenente una capsula con la scritta: "Ugualmente per i tisiaci ed i pleuritici così studierai la loro vita, ciò che sputeranno fuori getta nei carboni: se emanerà cattivo odore non potrà sfuggire alla morte. Nello stesso modo se vorrai provare in acqua, così lo proverai: su un piccolo fornello getta l'acqua dove sputa, e se ciò che avrà sputato galleggerà, rapidamente morirà; se va a fondo vivrà". Vi fu un fiorire di santi protettori dalle varie malattie: San Gervasio, veniva invocato contro il morbo di Pott, San Medardo contro la tisi intestinale (49).

In complesso si seguivano scolasticamente gli aforismi clinico-terapeutici di Ippocrate, spesso rimaneggiati e contaminati da credenze magiche, esoteriche, religiose (49).

1.8. LA SCUOLA SALERNITANA

Il merito di aver custodito e trasmesso le dottrine greco-latine spetta in larga misura alle scuole monastiche e laiche sviluppatasi in Europa nel Medioevo; tra esse si distinse la Scuola di Salerno, considerata come l'antesignana delle moderne università, uno dei centri di medicina più avanzati dell'Europa medievale, crogiolo di civiltà e religioni diverse (latina, greca, araba, ebraica). In scritti di molti prestigiosi insegnanti della Scuola, tra i quali spicca Arnaldo da Villanova (circa 1240-1313), catalano, venivano trattati concetti di patologia, di prognosi e di terapia della tubercolosi. La farmacopea antitubercolare era ricchissima di tisane e di sciroppi; un componente importante della dieta era il latte, di capra o di asina; era consigliato il soggiorno in aree temperate e secche; per l'emottisi uno dei rimedi più efficaci era considerato il salasso (49, 50).

1.9. IL MORBO REGIO

Nella cultura medievale veniva attribuito ai re e alle regine, collocati nella sfera del sacro tramite l'unzione con l'olio santo e l'incoronazione, il potere sovranaturale di compiere miracoli, in particolare di guarire le scrofole, linfadenopatie tubercolari latero-cervicali, molto comuni all'epoca. Il rituale di guarigione, solenne, consisteva nel "tocco reale" della persona ammalata, impartito pronunciando la formula: "Il Re ti tocca, Dio ti guarisce", a cui era associata l'usanza di offrire qualche moneta in elemosina (fig. 1.4). Tale cerimonia è ricordata anche da Shakespeare, nel *Macbeth* (IV, iii, 146). La prima allusione a tale pratica nella letteratura medica risale a Gilbertus Anglicus (circa 1180-1250), insigne rappresentante della Scuola Salernitana tra il 1180 e il 1190, che definì la scrofole "morbo



Fig. 1.4 - IL TOCCO REALE.



Fig. 1.5 - SAN MARCOLFO, PROTETTORE DALLA SCROFULA.

regio, perché curato dai re". Tale usanza, in principio osteggiata dalle autorità ecclesiastiche, venne in seguito legittimata anche dalla religione, tanto che il monarca veniva ritratto nelle chiese, a fianco dei santi. Successivamente, per limitare la potenza regale, il clero cercò di attenuarne la portata simbolica attribuendo la guarigione a un santo; fu designato come guaritore della scrofola (male del collo) San Marcolfo, probabilmente a causa dell'etimologia del suo nome: Marcol, in francese, comprende le parole *cou*, "collo", e *mar*, "male" (fig. 1.5). In virtù del potere magico attribuito al numero sette, anche ai settimi figli, cioè ai settimi nati di sesso maschile, veniva riconosciuta di tale prerogativa (7).

Sembra che il rituale del tocco possa esser fatto risalire al re Clodoveo di Francia, che avrebbe ricevuto il dono sovranaturale di guarigione a seguito della sua conversione al cristianesimo nel 496, se non addirittura a Gontrano (VI secolo). Fu tuttavia Filippo I (1060-1108) il primo sovrano francese a trattare specificamente le scrofole con questo gesto. Tale credenza era diffusa un po' in tutta l'Europa occidentale – anche qualche sovrano spagnolo e italiano si atteggiò a guaritore delle scrofole – ma fu in Francia e in Inghilterra che la cerimonia si radicò in maniera particolare e si protrasse per molti secoli, durante i quali furono trattate con il tocco reale migliaia di persone. In Gran Bretagna, la regina Anna compì l'ultimo rituale nel 1714, l'ultimo in assoluto fu il monarca francese Carlo X nel 1825 (7).

Non mancarono, tuttavia, approcci più razionali alla terapia della scrofola. Già nel VII secolo il medico bizantino Paolo di Egina (VII secolo d.C.) ne aveva proposto l'asportazione chirurgica, e tale pratica fu ripresa da Guy de Chauliac (circa 1280/1300-1368), francese, uno dei grandi maestri della chirurgia medievale. Arnolfo da Villanova, invece, ne sconsigliava l'asportazione, ritenendo che la ferita potesse divenire fonte di infezione. La Scuola Salernitana consigliava cure

locali a base di bile porcina, cataplasmi di fichi, instillazione nelle orecchie di olio misto a infuso di radici di rafano e foglie di lauro (50).

I.10. L'INTUIZIONE DI FRACASTORO

L'Umanesimo quattrocentesco porta all'affermazione dell'uomo in tutta la sua dignità, pensante e giudicante, e prepara la strada al Rinascimento, epoca di rinnovamento in tutti i campi delle espressioni del pensiero. L'invenzione della stampa da parte di Johann Gutenberg (circa 1394/1399-1468), intesa non solo come scrittura, ma anche come espressione figurativa ricca di illustrazioni, facilita la diffusione delle conoscenze mediche (49).

Risale a questo periodo la geniale intuizione di Girolamo Fracastoro (1483-1553), il quale, nel suo libro *De contagione et contagiosis morbis et curatione, libri tres*, edito a Venezia nel 1546, e in particolare nel capitolo "*De phthisi contagiosa*", fu il primo a ipotizzare che la natura contagiosa della tisi fosse dovuta a esseri viventi, invisibili, in grado di moltiplicarsi, *seminaria contagiorum*, semi del contagio, aventi affinità elettiva per il polmone e "*simpatia*" per persone con un terreno costituzionale idoneo. Non solo, si prefisse anche di distruggerli con fumigazioni di varie sostanze balsamiche e aromatiche – di prima scelta i caustici, se non fossero stati troppo lesivi per i tessuti –, tale pratica fu ripresa più avanti con l'invenzione di apparecchi appositi. Egli ipotizzò inoltre che la tubercolosi fosse dovuta a un'ulcera del polmone da cui fuoriusciva pus, molto tempo prima che la lesione fosse riscontrata in anatomia patologica. La trasmissione della malattia, dunque, non più imputata a elementi magici e occulti, poteva realizzarsi attraverso l'aria (già Aristotele aveva parlato di "*aria perniciosa*"), l'acqua e gli indumenti. Analogamente Giovan Battista da Monte, detto "Montano" (1489-1551), insegnante di medicina a Pavia, raccomandava nelle *Consultationes* di evitare di sputare sulle mura o nel letto; calpestare col piede nudo lo sputo di un tisico sarebbe stato sufficiente a contrarre la malattia. Altri Autori sottolineavano il rischio della convivenza matrimoniale e attribuivano al contagio le morti per tisi osservate con frequenza nella medesima famiglia. La portata dell'intuizione di Fracastoro non fu colta dal mondo scientifico contemporaneo, che continuò per lo più a considerare ereditaria la malattia; tuttavia la teoria della contagiosità fece presa sulla popolazione – non coadiuvata da nessuna misura sanitaria – e creò panico ed emarginazione (66).

Le terapie rimasero legate alla tradizione ippocratica, anche se Thomas Sydenham (1624-1689), illustre clinico inglese, contrappose ai precetti galenici di riposo quasi assoluto, sistematiche passeggiate a cavallo, in modo da sottoporre il torace a piccoli scuotimenti. Girolamo Fabrizio di Acquapendente (1536-1619), illustre anatomista e chirurgo, praticò interventi sul torace empiematoso, introducendo nel cavo pleurico una cannula d'argento, e raccomandò prudenza nell'asportazione dei linfonodi scrofolosi, consigliando di aspettare la loro colliquazione (49, 66).

Quasi contemporaneo di Fracastoro, Paracelso (1493-1541) si interessò per primo alla tisi dei minatori. L'argomento fu ripreso da Bernardino Ramazzini (1633-1714), ritenuto il fondatore della Medicina del Lavoro, che osservò come la tisi fosse frequente fra i lavoratori del vetro, i tessitori di seta e i tagliatori di pietre, sia per i vapori che si producevano durante la lavorazione, sia a seguito dell'inspirazione del pulviscolo. Spigelius (Adriaan van den Spiegel, 1578-1625), professore fiammingo di anatomia a Padova, attribuì la frequenza della tubercolosi in Inghilterra all'abitudine di fasciare

con abiti stretti il torace delle giovani donne. L'opera di Vesalio (1514-1564), grande anatomista del Rinascimento, aprì la strada alla pratica dell'autopsia e agli studi delle lesioni patologiche (59, 66).

I.11. IL TUBERCOLO

Nel 1600 nacque la scienza della dettagliata e paziente descrizione anatomico-patologica delle malattie. Appassionati studiosi furono caratterizzati da "illuminata sagacità e curiosità nel rintracciare le straordinarie mutazioni che lasciano la loro impronta sui cadaveri degli infelici estinti dalla tisi" (59). Nell'*Opera Medica*, pubblicata nel 1679, Franziscus de la Boe di Amsterdam (1614-1672), conosciuto come "Silvius" e considerato uno dei fondatori dell'anatomia patologica, quando ancora si era ben lontani dal riconoscere l'unitarietà della malattia, fu il primo a individuare una costante e caratteristica lesione, che definì "tubercolo", non solo nel polmone, ma anche negli altri organi colpiti da tisi. La parola *phima*, in greco, e successivamente *tuber* o *tuberculum*, in latino, era stata usata in origine da Ippocrate e Galeno come sinonimo di escrescenza, spesso di forma irregolare come una radice tuberosa. I tubercoli erano considerati da Silvius come delle "ghiandole" polmonari analoghe alla scrofolo, che potevano evolvere in cavità e ulcere; in seguito a tale considerazione, fu il primo a correlare tisi polmonare e scrofolo, considerate allora entità assolutamente distinte. Pur ammettendo che l'aria fosse la fonte del contagio, riteneva necessaria una predisposizione (diatesi) ereditaria, evidenziabile nell'*abitus* tisico ("difettosa" conformazione del torace e/o del polmone), che si appalesava più facilmente in età critiche della vita, quali pubertà e giovinezza (26, 59).

Richard Morton (1637-1698), eminente patologo inglese allievo di Silvius, descrisse la tisi come malattia febbrile debilitante e la distinse in tre stadi: iniziale infiammazione del polmone con formazione del tubercolo, ulcerazione e infine tisi. Ne individuò cinque principali cause: eredità, cattiva nutrizione, malconformazione del torace ereditaria o acquisita, introduzione di corpi irritanti nelle vie respiratorie, malattie debilitanti; ne aggiunse altre, quali il sovraccarico fisico e intellettuale, soprattutto notturno, e i patemi d'animo. Thomas Willis (1621-1675), correlò il deperimento organico dell'organismo alla lesione polmonare e descrisse varie forme di tisi: la cronica, caratterizzata da remissioni e riacutizzazioni, la miliare e la galoppante, contraddistinta da inizio repentino e progressione rapida, in grado di distruggere l'intero polmone in pochi mesi. Jean-Jacques Manget o Johann Jacob Mangetus (1652-1742), dedicò uno studio alla tubercolosi miliare, descrivendo in un caso autoptico "tubercoli così piccoli, da somigliare a semi di miglio, disseminati sull'intera superficie del polmone". Antonio Maria Valsalva (1666-1723) osservò che i tubercoli erano localizzati per lo più nel lobo superiore del polmone, meno attivo nella respirazione perché più lontano dal diaframma e dalle coste inferiori. Il suo allievo, Gian Battista Morgagni (1682-1771), da molti considerato il vero fondatore dell'anatomia patologica, non avendo dubbi sulla contagiosità della malattia, evitava di eseguire autopsie su persone tisiche per proteggere se stesso e i suoi studenti; nondimeno descrisse dettagliatamente numerose alterazioni anatomico-patologiche in vari organi, condividendo l'opinione di Silvius e Morton che il tubercolo fosse una lesione costante della tisi (fig. 1.6) (26, 59).

La meningite tubercolare venne descritta per la prima volta nel XVIII secolo dal neurologo di Edimburgo Robert Whytt (1714-1776). William Stark (1741-1770) fu il primo a descrivere minuziosamente che i tubercoli andati incontro a cavitazione comunicavano attraverso minuti forellini

Fig. 1.6 - GIOVAN BATTISTA MORGAGNI. TRATTATO DI ANATOMIA PATOLOGICA.



con trachea o bronco, mettendo la cavità in comunicazione con l'esterno. Stark ipotizzò inoltre che i tubercoli fossero strutture indipendenti dai linfonodi. Tale opinione fu condivisa anche da Matthew Baillie, anatomista scozzese (1761-1823) che descrisse la confluenza di tubercoli miliariformi in masse più voluminose e introdusse il concetto di materiale "scrofoloso", destinato ad essere denominato successivamente "caseoso". Antoine Portal (1742-1832) propose il cambiamento del nome da "scrofoloso" a "tubercoloso" e modificò il concetto di tubercolo da semplice escrescenza a lesione localizzata nel polmone assomigliante "a ghiandola"; tale accezione venne successivamente estesa a tutti i noduli analoghi ritrovati nel resto dell'organismo. Gaspard Laurent Bayle (1774-1816) descrisse minuziosamente sei tipi di tisi, calcolosa, granulare, tubercolosa, ulcerosa, melanotica, cancerosa e confermò il nome di "miliare" per i piccoli tubercoli disseminati. Introdusse il concetto di "diatesi tubercolosa", definita una disposizione particolare che permetteva la diffusione dei tubercoli simultaneamente a più organi. Sostenne inoltre lo sviluppo diretto dei tubercoli, dando loro una dignità "specificata" e rivoluzionando le teorie del tempo che ritenevano indispensabile una preesistente lesione infiammatoria dell'organo colpito (29, 40, 59).

Sir Percivall Pott (1714-1788), eminente chirurgo, tra i fondatori dell'ortopedia, descrisse nel 1779 e nel 1782 la spondilite tubercolosa, con la caratteristica deformità cifotica, associata all'ascesso dello psoas. Nel XVIII secolo altri autori, tra cui Hovius, Camper, Bonn e Coopmans, descrissero la stessa patologia in Francia, Inghilterra e Olanda (48).

1.12. I PRIMI PROVVEDIMENTI

Fu proprio in Italia che, a seguito della diffusione tra la popolazione della teoria della contagiosità formulata da Fracastoro e ripresa da altri medici, si presero fra il 1600 e il 1700 i primi provvedimenti di sanità pubblica indirizzati alla prevenzione del contagio (fig. 1.7). Nella Repubblica di Lucca nel 1699 fu compilato un elenco di persone malate con finalità di prevenzione del rischio infet-



Fig. 1.7 - EDITTO DI NAPOLI
CONTENENTE NORME IGIENICHE PER LA
PREVENZIONE DELLA TISI, 1782.

tivo rappresentato “dalle robe che restano dopo la morte di persone infette di etisia e altri morbi simili”. Fu anche permessa l'autopsia per studiare le cause della malattia e nel 1733 fu emanata, per la prima volta, la disposizione di isolare le/i tisici in un reparto speciale evitando di ricoverarli in ospedali comuni. Nel 1753, a Firenze, fu promulgata una legge che privava le persone tisiche di tutti i diritti. In varie città italiane fu istituita la denuncia obbligatoria di tutti i soggetti tisici, senza alcuna eccezione di classe sociale, nonché il divieto di asportazione e di commercio degli oggetti d'uso non disinfettati. Dopo la morte era prevista la disinfezione di mobili, vestiti, biancheria, materassi, guanciali. Fu istituito l'obbligo di sputare esclusivamente nelle sputacchiere. Misure analoghe furono prese più tardi in Francia e in Spagna. A Napoli, già nel 1776, si iniziò a isolare le/i tisici in una sala separata dell'ospedale. A Siracusa ai primi del 1700 fu istituita la prima forma di assistenza sociale, con la creazione di un Monte che prevedeva sussidi per i poveri e i proprietari di case abitate da malate/i di tisi, per gli opportuni interventi sanitari. Tali misure di politica sanitaria, sia per l'affermarsi della corrente che sosteneva l'ereditarietà della malattia, sia per le difficoltà pratiche legate alla mancanza di un'organizzazione adeguata, stentaron ad affermarsi e furono in gran parte abbandonate verso la fine del Settecento (66).

1.13. IL VAMPIRISMO

In pieno Illuminismo, la superstizione fece esplodere la convinzione dell'esistenza dei vampiri, che, originata nei Paesi balcanici, divampò in Europa, specie in Germania, Francia e Italia e raggiunse presto l'America, riallacciandosi proprio alla tubercolosi. Si diffuse la credenza che una persona morta di tisi potesse, anche a distanza di anni, uscire dalla tomba, per succhiare sangue – e con il sangue man a mano le forze – ai familiari, portandoli alla consunzione e facendoli divenire a loro volta vampiri/e; vampirismo, dunque, come metafora del contagio. La presenza della malattia in più membri della stessa famiglia aveva trovato la sua spiegazione. La tisi causa del vampirismo e i vampiri propagatori della tisi, in una catena inarrestabile di eventi! La/il vampiro aveva, inoltre, le connotazioni fisiche stesse tipiche della tisi, magrezza, pallore, sangue alla bocca, occhi arrossati e febbrili, e ne provocava l'identico terrore (fig. 1.8). La tisi poteva essere vinta soltanto eliminando i vampiri, uomini e donne,

Fig. 1.8 - IL VAMPIRO.
SCENA TRATTA DAL
FILM NOSFERATU -
EINE SYMPHONIE DES
GRAUENS, REGIA DI
FRIEDRICH WILHELM
MURNAU, 1922.



riesumandone il cadavere e bruciandone cuore o corpo. In reazione a una scienza medica impotente e ritenuta dal volgo di nessuna utilità, dato che considerava la tubercolosi incurabile, migliaia di sepolture vennero violate (6).

Studi archeologici recenti, in Connecticut, in un cimitero di famiglia abbandonato risalente ai secoli XVIII e XIX, documentano la disposizione di ossa, appartenute a un uomo tifico, secondo un rituale tipico della superstizione legata a vampirismo e tubercolosi (73). Michael Bell, nel suo libro *Food for the Dead* rievoca racconti popolari in cui riesumazioni di cadaveri e roghi di cuori erano descritti come unica “terapia” possibile per i parenti. Paradigmatica la storia di Mercy Brown, diciannovenne, morta di tisi nel 1892, dopo la sorella maggiore e la madre; per salvare il fratello malato, si riesumarono i tre cadaveri. La ragazza, il cui cuore era ancora pieno di sangue, fu ritenuta responsabile della trasmissione della malattia. Il cuore venne bruciato e le ceneri, miste ad acqua, furono date da bere al fratello, in modo da restituirgli le forze che gli erano state succhiate. Episodi analoghi sono ben documentati tra il 1799 e il 1892 nel Nord America. Le ricerche di Bell suggeriscono, inoltre, la possibilità che vampirismo e tubercolosi fossero, in certe comunità dell’Ottocento, considerate sinonimi (6).

Anche in ambiente scientifico non si escludeva che il sangue, caratteristico nutrimento dei vampiri, potesse essere fonte di contagio. Morton riteneva che “la causa prima della tisi derivasse da una depravazione del sangue”; Parola scrisse, in accordo con Fornasini, quanto fosse importante studiare il sangue “siccome è nei segreti del sangue medesimo che si ordiscono quei dissesti che poscia, colla produzione della tubercolosi, si palesano” e ancora “... questa alterata composizione del sangue, sia fonte sia effetto di malattia...” (59). In un diario, un medico si rivolgeva alla tisi con queste parole: “Per quale infernale raffinatezza... hai escogitato di renderti manifesta solo quando ti sei irrimediabilmente assicurata la tua vittima e le tue zanne sono rosse del suo sangue?” (60). Come scrisse Areteo “... per dirla in una parola, qualunque profluvio di sangue ha sempre per sinto-

mi lo spavento, il sospetto, la disperazione della vita. E chi è mai sì forte e sì costante, che vedendosi preso da un morbo che lo somigli ad un animale scannato non tema una prossima morte e non ne abbia orrore?” (59).

Per estensione, anche la pratica estremamente diffusa del salasso come terapia contro l'emottisi, fu talora associata al vampirismo (14).

I.14. L'INFINITESIMAMENTE PICCOLO

Il 1600 fu anche il secolo dell'invenzione del microscopio, sviluppato come prototipo, secondo la maggior parte degli storici, dall'ottico olandese Zacharis Jansenn (circa 1585-1636) nel 1591, e perfezionato da Galileo Galilei (1564-1626) nel 1609. Una data fondamentale fu il 1676, anno in cui Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) riuscì a vedere al microscopio dei protozoi; le porte dell'infinitesimamente piccolo stavano finalmente dischiudendosi (49).

Benjamin Marten, nato tra il 1690 e il 1695 e morto all'età di circa sessant'anni, ipotizzò, nel 1720, nella sua opera *A New Theory of Consumption* che la tubercolosi fosse causata da “piccole creature viventi (*animalculae*)” che, una volta entrate nel corpo, erano in grado di provocare lesioni e sintomi. Marten scrisse: “la malattia può venir trasmessa ereditariamente dalla madre anche nel grembo, ma anche da persona a persona, specie in persone con resistenza costituzionale limitata come i bambini; dopo prolungato contatto, mangiando, bevendo, ma anche solo conversando a ravvicinata distanza se una parte dell'aria espirata entra nel polmone della persona sana” (20).

La scienza medica rimaneva comunque divisa fra due scuole di pensiero. A parte pareri discordanti di singoli studiosi, le scuole del Nord Europa, ritenendo la tubercolosi ereditaria, denigravano la teoria della contagiosità, “appannaggio di pochi profani e medici meridionali”; nel Sud Europa, invece, era più radicata nella scienza medica e nella popolazione l'ipotesi infettiva (17).

I.15. IL ROMANTICISMO

Verso la fine del XVIII secolo si affermò, in antitesi con il Neoclassicismo, un nuovo movimento, il Romanticismo, che rivalutava la sfera del sentimento, della passione, dell'irrazionalità, e che avrebbe influenzato tutto il XIX secolo, proprio quando la tubercolosi, implacabile, flagellava l'Europa. “Classico è ciò che è sano, romantico ciò che è malato”, affermava Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832), poeta e scrittore tedesco (36).

E fu proprio la tisi a divenire la malattia romantica per eccellenza. Un'aura di eccezionalità veniva attribuita a chi ne era colpito. Considerata malattia edificante, raffinata, segno di eleganza, delicatezza, vulnerabilità, avrebbe scelto come bersaglio proprio “gli uomini di più grande talento, le donne dall'aspetto più attraente e dalla sensibilità più spiccata”. Era ritenuta di natura costituzionale, familiare, favorita da uno stile di vita irregolare, *bohémienne*, moralmente non retto, espressione indiretta di una sensibilità originale e d'élite. Le lettere del poeta John Keats (1795-1821) e della scrittrice George Sand (1804-876), che fu vicina a Chopin, suo amante, fino alla morte per tisi, sono fitte di indignati riferimenti all'assurda paura del popolo italiano nei confronti della trasmissibilità della tisi, trasmissibilità tenacemente osteggiata in quanto l'avrebbe riportata nel novero delle malattie

“comuni”. L’associazione con la sensibilità – la “irritabilità nervosa” – era peraltro già iniziata nel Settecento, quando la tisi, ai suoi primi stadi, era stata confusa con quegli evanescenti mali chiamati “dei nervi” (13, 60, 74).

Già gli antichi Greci avevano osservato la *spes phthisica*, stato di straordinaria fiducia e creatività della mente, in palese contrasto con la condizione fragile e debilitata del corpo e l’idea era radicata nella letteratura medica fin dal 200 d.C. In epoca romantica ne venne ipotizzato un fondamento organico, la produzione di “tossine” in grado di stimolare genialità e talento e si radicò la convinzione che la guarigione della tisi avrebbe portato con sé un declino culturale. Scriveva Thomas Mann (1875-1955) in *Der Zauberberg (La montagna incantata)*: “La malattia ti dà la libertà. Ti rende... ecco, ora mi sovviene la parola che non ho mai usata! Ti rende geniale”. Nel libro di Erich Ebstein edito nel 1932 *Tuberkulose als Schicksal (Tubercolosi come destino)* sono ricordati innumerevoli straordinari artisti, uomini e donne – scrittori, poeti, pittori, drammaturghi, musicisti – che avendo sofferto della malattia ed essendone, in molti casi, morti, l’avevano raccontata o illustrata (13, 74).

La percezione di avere una vita breve e la prospettiva di morte prossima – la tisi colpiva per lo più persone giovani – alteravano il senso di sé e del tempo. “Il tempo è poco”, soleva dire Fryderyk Franciszek Chopin (1810-1849). L’isolamento conseguente alla malattia, i lunghi periodi di inerzia, i periodi di remissione e di riacutizzazione, la tosse incessante e l’emottisi, l’atmosfera di morte, favorivano l’introspezione e la riflessione; nacque la percezione della malattia e della morte come consapevolezza del proprio destino individuale. John Keats venticinquenne, vedendo una goccia di sangue cadere sul foglio, scrisse: “È sangue arterioso... la mia condanna a morte, devo morire” (13, 53).

La frenetica vitalità, nata come rivolta violenta verso il feroce destino che colpiva nel fiore degli anni, non era solo intellettuale, ma anche fisica, sessuale. La leggenda (o la verità?) di una libido esacerbata e ispirata dalla malattia risaliva già a Ippocrate, che consigliava l’astensione dai rapporti sessuali; prudenza e astinenza venivano comunemente raccomandate dai medici in sanatorio, regola peraltro spesso disattesa. L’allarmante reputazione di una vita dissoluta – ad esempio gli innumerevoli amanti di Marie Duplessis (1824-1847), gli affari amorosi delle attrici Rachel (1821-1858) e Sarah Bernhard (1844-1923), l’erotismo di David Herbert Lawrence (1885-1930) e la vita passionale nei sanatori –, che non solo era conseguenza della malattia, ma ne era anche causa, era diffusa nella cultura medica e nell’opinione pubblica. Manuali di educazione consigliavano di tenere le adolescenti “lontano dalla tisi” e dalle feste mondane che l’avrebbero provocata, non già per preservarne la salute, ma la castità. Tale esaltazione dei sensi, nelle fanciulle e nelle donne, era già stata peraltro descritta secoli prima da Morton come “isteria tubercolare” (13, 34).

Ma la tisi era considerata anche purezza, una malattia del corpo che non contaminava l’anima, anzi la esaltava e la nobilitava. Lo scrittore inglese Charles Dickens (1812-1870) considerava la tisi “lotta tra anima e corpo”, finché “la parte mortale si consumava ed avvizziva” e “lo spirito poteva librarsi lieve e fiducioso”. Anche il soggiorno in sanatorio, tra le vette nevose, in alta montagna, veniva interpretato come un’elevazione dell’anima a più nobili orizzonti, e la tisi il modo inedito di giungere a conoscenze inaccessibili all’uomo sano.

Ed ancora, tisi era sinonimo di bellezza. Scriveva Karl Rosenkranz (1805-1879), filosofo, successore di Kant, che la tisi costituiva un’eccezione all’identità consueta tra bellezza e salute. “Il dimagrimento, lo sguardo bruciante, le guance arrossate dalla febbre o pallide... in tutto e per tutto espres-

sione soltanto dell'anima", costituivano l'essenza della bellezza, conferendo straordinari poteri di seduzione. Era di moda essere pallide/i "come la morte in persona" e smunte/i; "Non si può essere mai troppo ricchi, mai troppo magri", soleva dire la contessa di Windsor. Secondo lo scrittore statunitense David Henry Thoreau (1817-1862) "... la morte e la malattia sono spesso belle... come il colorito febbrile della consunzione". Dipinti di Amedeo Modigliani (1884-1920) ne illustrano in modo magistrale i caratteri (fig. 1.9). Pallore, aspetto filiforme, grazia costituivano l'aspetto ideale della donna, canone di bellezza, peraltro, giunto fino ai nostri tempi (60, 74).

E non poteva mancare l'amore. "Che la malattia venisse associata all'amore e chiamata anche *tuberculosis amatoria* non sorprende: l'età del primo amore diveniva anche l'età della morte" (71). La tisi divenne metafora della malattia di amore, sia sensuale che spirituale; febbre come passione e incendio interiore, alternarsi di speranza e disperazione in armonia con le fasi di remissione e riacutizzazione, con il destino, infine, di consumarsi fibra per fibra, impercettibilmente, di spegnersi piano, come lo stoppino di una lampada senza più olio. "I sintomi della malattia non sono altro che una manifestazione mascherata della potenza dell'amore; e l'intera malattia è soltanto amore trasformato", scriveva Thomas Mann (74).

Tra tutte, fu una giovanissima prostituta, Alphonsine Plessis, nota come Marie Duplessis, "cortigiana" nel *demi-monde* di Parigi, a divenire l'icona immortale, celebrata e amata, della tisi, incarnandone gli ideali romantici di bellezza, sensualità, purezza, malattia, amore, morte (fig. 1.10). La sua storia fu raccontata da Alexandre Dumas figlio (1802-1870) in *La signora delle camelie* e tradotta nella sublime opera *La Traviata* da Giuseppe Verdi (1813-1901), in cui la tisi, la malattia della gente comune dell'epoca, assume dignità di protagonista assoluta (27, 62, 71).

1.16. LA CLINICA

Durante la prima parte dell'Ottocento furono fatti i primi progressi in ambito clinico.

Nel 1815 Thomas Yuong pose l'accento sulla diagnosi precoce, descrivendone come sintomi malessere generale, lieve dispnea, tosse senza dolore. Il primo progresso della diagnostica della tubercolosi *in vivo* dai tempi greco-romani fu l'invenzione, nel 1761, da parte di Leopold Joseph Auenbrugger (1722-1809), della tecnica di percussione, che permetteva di intuire lo stato della cavità toracica dai differenti suoni prodotti dalla percussione della sua parete. Medico e compositore, egli utilizzò la sua sensibilità per la musica e per i suoni al fine di correlare, per anni, i reperti di percussione *in vivo* con i ritrovati autoptici. Il suo lavoro, pubblicato in latino, non ebbe un grande riscontro all'epoca e la tecnica si diffuse soltanto dopo la traduzione in francese fatta da Jean Nicolas Corvisart (1755-1821) nel 1808 (48).

Allievo di Corvisart, René Theophile Hyacinthe Laennec (1781-1826), fondatore della medicina moderna, diede un enorme impulso alla clinica della tubercolosi. Da mero osservatore di sintomi, come lo erano i medici dai tempi di Ippocrate, si trasformò in ingegnoso esploratore *in vivo* come, da patologo, lo era *post-mortem*, al tavolo autoptico. A tal fine perfezionò la tecnica di percussione, dividendo il torace in quindici regioni e consentendo una più precisa definizione topografica degli organi toracici e delle loro patologie. Vedendo dei ragazzi con l'orecchio appoggiato a una delle estremità di lunghi pezzi di legno divertirsi ad ascoltare i colpi battuti dai compagni all'altra estremità

tà, ebbe l'idea di utilizzare un foglio di carta arrotolato per auscultare il torace: era nato il primitivo stetoscopio, dal greco *stethos* (torace) e *scopeo* (esamino), perfezionato in seguito con l'introduzione di un cilindro di legno (fig. 1.11). La percussione e l'auscultazione del torace, oggettivabili, gli permisero di correlare la clinica ai reperti dell'anatomia patologica, che aveva studiato con maestri del calibro di Marie François Xavier Bichat (1771-1802), ritenuto uno dei padri dell'istologia, Bayle e Guillaume Dupuytren (1777-1835). La tubercolosi costituì per Laennec il principale campo di applicazione del metodo anatomo-clinico di studio delle malattie da lui ideato, fondamento nella moderna medicina; grazie a tale approccio gli fu possibile studiare l'evoluzione delle lesioni e individuare segni caratteristici di ogni stadio della malattia. Non credendo alla natura contagiosa della malattia, che pur contrasse e di cui morì all'età di appena 45 anni, ritenne che esistesse una predisposizione ereditaria; tra i fattori predisponenti incluse anche la depressione mentale di lunga durata (30, 46).

Fig. 1.11 - STETOSCOPIO DI LAENNEC, REALIZZATO IN LEGNO E OTTONE.



Una delle sue più grandi intuizioni fu, nel 1819, l'inquadramento delle varie forme tubercolari (tisi, scrofola, miliare) in un'entità nosologica unica, caratterizzata dalla presenza di tubercoli, dai più piccoli miliariformi alle larghe masse caseose, capaci di aggredire qualsiasi organo del corpo. In contrasto con Bayle, suo amico e collega, che distingueva sei forme di tubercolosi, negò che queste fossero entità diverse sostenendone la corrispondenza solo a diversi stadi del tubercolo. Dal suo dogma, in base al quale la tisi non può prescindere dalla presenza di tubercoli, scaturì la fondamentale conclusione che "tisi equivale a tubercolosi". Tale teoria, ripresa da Silvius e Morton, e condivisa dall'anatomista e patologo viennese Karl von Rokitansky (1804-1878) fu tenacemente avversata da eminenti scienziati. Tra questi vi fu anche Johann Lukas Schoenlein di Wuerzburg (1793-1864), il creatore del termine "tubercolosi", il quale sosteneva che scrofola, tubercoli e tisi fossero entità separate inquadrate come "ematosi"; concetto peraltro già espresso da Giovan Battista Morgagni a Padova e ripreso più tardi, a Berlino, da Rudolf Virchow (1821-1902), fondatore della patologia cellulare. L'autorevolezza scientifica di quest'ultimo fu a lungo di ostacolo all'accettazione della teoria unitaria proposta da Laennec (40).

I.17. LA NATURA DELLA MALATTIA

La disputa degli “*opinion leader*” non riguardava solo l’unitarietà o meno della malattia, ma anche la sua natura. Laennec riteneva la tisi una malattia tumorale analoga al cancro e perciò incurabile; Auenbrugger, l’inventore della tecnica percussoria, notando l’associazione fra arrivo delle giovani reclute nelle caserme cittadine e sviluppo di malattia, ne attribuiva la causa alla sofferenza per la perdita di libertà e alla nostalgia di casa. Persino Philipp Klenked (1813-1881) che pur nel 1843, iniettando materiale caseoso per via intravenosa a un coniglio ne aveva determinato l’infezione generalizzata e la morte, considerava la malattia di natura tumorale. Karl von Rokitansky, patologo boemo, ne negò la natura infettiva. Friedrich Gustav Jakob Henle (1809-1885), anatomista, patologo e zoologo tedesco, uno dei padri della teoria microbica delle malattie infettive, nel 1840 sviluppò i concetti di *contagium vivum* e *contagium animatum*, riallacciandosi ai lavori di Girolamo Fracastoro e Agostino Bassi (1773-1856), ed elencò alcuni postulati necessari per poter definire “infettiva” una malattia. Nel 1844 egli ipotizzò che la tubercolosi potesse “essere contagiosa, in alcune circostanze, in presenza di una certa predisposizione” (40).

I.18. LA TRASMISSIBILITÀ

Jean-Antoine Villemin (1827-1892), medico militare francese, fu il primo a dimostrare, nel 1865, la trasmissibilità della tubercolosi. Con rigorosi esperimenti provò che la si poteva trasmettere dall’uomo, o dai bovini, ad altre specie animali nonché da animale ad animale, mediante inoculazione di escreato, sangue, estratti di tessuto linfonodale e polmonare. Egli giunse alla conclusione che la causa fosse un agente vivente (“virus”), presente nell’aria, con capacità di attecchire e di moltiplicarsi nei tessuti, smentendo l’opinione diffusa che la tubercolosi potesse generarsi spontaneamente in seguito a vari stimoli (teoria della generazione spontanea) ed escludendo che malnutrizione, miseria, condizioni metereologiche, eredità, tipo di lavoro e malattie progressive potessero essere di per sé causa di malattia. Gli stessi tubercoli, lungi da rappresentare l’eziologia della malattia, ne contenevano soltanto l’agente. Essendo riuscito a produrre caratteristiche manifestazioni della tubercolosi inoculando materiale scrofoloso, fu tra i primi a concludere che le forme avessero un’origine unica. Si occupò anche di epidemiologia e notò che la malattia era diffusa maggiormente nelle comunità chiuse, quali caserme, prigioni, industrie, monasteri, mentre colpiva in modo minore le persone che vivevano all’aria aperta. Come rimedio, suggerì un miglioramento delle condizioni abitative e lavorative, il mantenimento di alti standard di salute e la disinfezione degli oggetti e dei luoghi contaminati dalle persone affette da tisi, ponendo l’accento sulla prevenzione, poiché riteneva assolutamente incurabile la malattia (4).

La reazione dell’Accademia Francese di Medicina alle scoperte di Villemin, che rovesciavano le opinioni del tempo, fu di aspro scetticismo. L’idea del contagio era ritenuta una reliquia del passato, una specie di superstizione rimasta viva tra il popolo ignorante che seminava paura e diffidenza tra la gente, opponendo sano e malato. Uno dei più accaniti oppositori di Villemin fu Hermann Pidoux (1808-1882), destinato ad essere ricordato dai posteri come paladino della medicina tradizionale e nemico ostinato del progresso, che si scagliò contro ciò che riteneva “l’arcaica ipotesi di un germe vivente, dotato di anima propria, derivata dalla dottrina animista del Medioevo, suggestiva certo, ma

naïve e di provenienza dal volgo”. Pidoux, che aveva una spiccata sensibilità verso gli aspetti sociali della malattia, in qualche modo si rese conto delle implicazioni tremende dell’asserzione di Villemin, a cui strenuamente si oppose anche per questo, temendo che avrebbe seminato disperazione e provocato ulteriore emarginazione delle persone ammalate: “... quale calamità risulterebbe... scatenerebbe paura e diffidenza e pregiudizio verso i poveri tubercolotici, egoismo al posto di tenerezza da parte dei familiari... una teoria da non proclamare ad alta voce...” dirà con sgomento e angoscia (4).

Quasi contemporaneamente a Villemin, nel 1867, William Budd (1811-1880), studioso di epidemiologia, giunse a conclusioni analoghe; asserì l’essenza della tubercolosi come entità specifica, analoga a sifilide, scarlattina, tifo, che si propaga da una persona all’altra nella società solamente attraverso il materiale tubercolare, escludendo un’origine spontanea della malattia; ipotizzò che la distruzione di tale materiale con appropriate sostanze chimiche, assieme all’introduzione di norme igieniche, avrebbe potuto debellare il morbo. Theodor Klebs (1834-1913), nel 1877, tentò di far crescere il microrganismo su albume d’uovo prima di inocularlo nelle cavie, e sostenne di aver trovato un organismo mobile, che chiamò *monas tuberculosis*, che considerò essere responsabile della malattia. Altri studiosi descrissero il bacillo all’interno del tubercolo, ma non riuscirono né a coltivarlo, né a colorarlo. Pare che Paul Clemens von Baumgarten (1848-1928), patologo tedesco di Tuebingen, fosse riuscito a vedere un bacillo non colorato in materiale caseoso trattato con idrossido di sodio; la notizia fu tuttavia resa pubblica solo dopo la scoperta di Koch (40).

1.19. LA BATTERIOLOGIA

Fu Heinrich Hermann Robert Koch (1843-1910), a soli 38 anni, a produrre l’irrefutabile dimostrazione che la causa della tubercolosi era uno specifico germe, il “bacillo tubercolare”, lavorando con tenacia secondo un rigoroso metodo scientifico, diviso tra obitorio, microscopio e animali da esperimento.

La prima difficoltà fu mettere a punto una tecnica di colorazione del bacillo, della cui esistenza era certo, essendo un convinto assertore della trasmissibilità della tubercolosi già dimostrata da Villemin. Dopo aver tentato inutilmente di mettere in evidenza il bacillo con i coloranti all’epoca conosciuti, si verificò un evento fortunoso. Un giorno, utilizzando per l’ennesima volta il blu di metilene, introdotto da Paul Ehrlich (1854-1915), antesignano delle colorazioni tessutali, inaspettatamente riuscì a evidenziare per la prima volta nella storia dell’umanità piccoli bastoncini all’interno delle lesioni tubercolari. Ancora più inspiegabilmente, quando Koch provò a controcolorarli con vesuvina (bruno di Bismarck) per aumentare il contrasto, notò come essi, a differenza di altri batteri, avessero trattenuto il colorante blu e non avessero assunto quello marrone. Le successive ripetizioni dell’esperimento, utilizzando blu di metilene appena preparato, non confermarono però il risultato. A Koch non sfuggì, tuttavia, la coincidenza che l’unica colorazione riuscita era stata eseguita un giorno in cui l’aria del laboratorio era satura di ammoniaca per un precedente esperimento. Ne concluse che il blu di metilene poteva essersi alcalinizzato e aggiunse una base forte al colorante: era nata così la prima tecnica in grado di differenziare i bacilli tubercolari da tutti gli altri batteri (fig. 1.12).

Il processo di colorazione venne poi perfezionato, nel 1882, da Ehrlich, che colorò i campioni con una mistura di violetto genziana o fucsina (invece che con blu di metilene) e con anilina (invece



**Fig. I.12 - RAFFIGURAZIONE
DI BACILLI TUBERCOLARI AL
MICROSCOPIO.**

che con ammoniaca), per poi trattarli con acido nitrico. Questo tipo di colorazione venne denominata come acido-resistente, poiché l'acido non provocava decolorazione. Una successiva rielaborazione fu eseguita da Franz Ziehl (1857-1896), medico a Heidelberg, che sostituì l'anilina con acido carbolico (e successivamente con carbolfucsina) e da Friedrich Neelsen (1854-1894), medico a Rostock, che usò fucsina e acido solforico al posto di violetto genziana e acido nitrico. La colorazione, secondo il metodo di Ziehl-Neelsen, tuttora in uso, che colora in fucsia i batteri alcol-acido-resistenti e gli altri batteri e i tessuti in azzurro, era già stata messa a punto appena un anno dopo la scoperta del bacillo tubercolare. La colorazione di Ehrlich con violetto di genziana fornì inoltre le basi per Hans Christian Gram (1853-1908) per approntare la sua importante procedura di colorazione (8).

La presenza (anche se costante) del bacillo in sede di lesione non dimostrava però che esso fosse la causa della malattia; era necessario, per questo, riuscire a coltivarlo. La questione non era scevra di difficoltà, in quanto il bacillo cresceva molto più lentamente degli altri batteri, a temperature simili a quelle corporee; un arduo problema, in quanto la gelatina, usata come nutriente, a quella temperatura fluidificava. Koch pensò dunque di coagulare del siero, in modo da ottenere un terreno solido, inclinandolo in provetta per aumentarne la superficie; perfezionò i nutrienti e introdusse per primo la semina su terreni agarizzati a base di patata (8). Infine, l'inoculazione di una coltura pura dei bacilli negli animali da esperimento, qualunque fosse la dose, la via di inoculazione o la specie animale testata, era in grado di provocare lesioni e sintomi di tubercolosi (8).

Koch aveva così soddisfatto pienamente i prerequisiti proposti dal suo maestro Jacob Henle per definire una malattia "infettiva". I postulati (detti di Koch o di Henle-Koch), necessari per stabilire

una relazione causale tra microbo e malattia, ridefiniti insieme a Friedrich Loeffler (1852-1915) e pubblicati nel 1890, erano quattro: il germe deve essere trovato in tutti gli animali affetti dalla malattia, ma non nei sani; deve poter essere isolato da un animale ammalato; se reintrodotta in coltura pura in un animale sano deve causare malattia; deve poter essere isolato nuovamente dall'animale sperimentalmente ammalato (8, 40).

Koch presentò il suo lavoro in una lettura dal titolo *“Die Aetiologie der Tuberculose”* (*L'eziologia della tubercolosi*) al Congresso della Società di Fisiologia dell'Università di Berlino la sera del 24 marzo 1882, portando con sé l'intero armamentario di laboratorio, tubi di coltura con crescita del bacillo, vetrini, coloranti, giare contenenti tessuti e organi, dinanzi a un'assise dei più eminenti nomi del tempo, in un silenzio assoluto e attonito. Rudolf Virchow, patologo cellulare, il “Professore dei Professori” abbandonò l'aula senza replicare. Riferirà Paul Ehrlich, premio Nobel nel 1908, inventore della chemioterapia, che “quella sera rimase impressa come l'evento scientifico più impressionante a cui avesse mai assistito”. Si era scoperta la causa della malattia che aveva ucciso e stava uccidendo più persone di qualunque altra in tutta la storia dell'umanità, definita da John Bunyan (1628-1668), sacerdote e scrittore, “il Capitano di tutti gli uomini della morte”. La notte stessa partirono i primi cablogrammi e la notizia si diffuse rapidamente in tutto il mondo, che ne rimase elettrizzato. In Europa e in America Koch fu considerato un eroe, in Giappone gli venne dedicato un santuario come a un semidio (8, 40).

1.20. LA TUBERCOLINA

Nel 1890, lo stesso anno in cui Emil von Behring (1854-1917) e Shisababuro Kitasato (1852-1931) inaugurarono l'epoca della sieroterapia con le antitossine di tetano e difterite, Koch annunciò, al decimo Congresso Internazionale di Medicina a Berlino, di aver isolato la “tubercolina”, un liquido stabile, chiaro, di colore marrone scuro, in grado di inibire la crescita del bacillo nelle colture di laboratorio e nelle cavie, senza tuttavia, probabilmente in seguito a pressioni politiche, rivelarne la natura. Avvolta da un alone di mistero e circondata da enormi aspettative in un mondo appena elettrizzato dalla scoperta del bacillo, la stampa diede ampio risalto alla notizia e, ancor prima che ne fossero provate l'efficacia e la sicurezza, a Koch furono attribuite onorificenze; innumerevoli pazienti giunsero da tutto il mondo a Berlino in cerca della miracolosa terapia. Una cocente delusione seguì, quando la tubercolina, estratto glicerico di bacilli morti, come svelato da Koch nel 1891, non rivelò alcun potere terapeutico sull'essere umano. Le persone sane in qualche caso non mostrarono alcuna reazione alla sua inoculazione, in altri andarono incontro a reazioni cutanee o generalizzate con vomito, brividi, febbre, e in qualche caso a morte. Koch, dopo essersi iniettato tubercolina concentrata, ebbe un violento attacco febbrile e concluse, con notevole preveggenza, che “sarebbe potuta divenire un potente strumento diagnostico, soprattutto nei casi dubbi, quando i bacilli non erano evidenti nell'escreato” (8, 17).

Nel 1907, Clemens Peter von Pirchet (1874-1929), pediatra illustre nel campo dell'immunologia, che aveva ideato la teoria dell'allergia e scoperto la risposta anamnesticca, venuto a conoscenza della reazione di Koch all'autoinoculazione di tubercolina, utilizzò una lancia da vaccinazione per introdurre una piccola quantità di tubercolina diluita in sede cutanea. Due anni dopo, in seguito a

studi più accurati su bambine/i, stabili che, per definire positivo il test, era necessaria l'evidenza di un'area indurita ed eritematosa in sede di inoculo, letta il giorno dopo l'inoculazione, del diametro minimo di 5 mm. Più avanti altri immunologi correlarono tale fenomeno alla risposta immunitaria che va sotto nome di ipersensibilità ritardata. Definita "allergia" la risposta positiva alla tubercolina e "anergia" quella negativa, asserì, che in caso di positività, era possibile concludere che la/il bambino, pur non in assenza di sintomatologia, era comunque affetto da tubercolosi. Fu lo stesso Clemens che introdusse per tale condizione il termine "tubercolosi latente o infezione tubercolare latente", tuttora in uso (16). Nel 1908 Charles Mantoux (1877-1947), medico francese, modificò la tecnica di inoculazione, "*Intradermo-réaction de la tuberculine*" introducendo l'uso di una siringa con ago cannulato per iniettare il preparato in sede intradermica. Nel 1934, nell'Istituto Henry Phipps di Filadelfia, una donna, Florence Seibert (1897-1991), sviluppò una tecnica di estrazione delle proteine di *Mycobacterium tuberculosis* dopo crescita sui terreni di coltura e uccisione a 121 °C a una pressione di 1,5 atmosfere. Questa preparazione, denominata "*Purified Protein Derivate*" (PPD), permise la standardizzazione del prodotto usato rendendo riproducibili i risultati e fu adottata come standard nel 1941 negli USA e, un anno più tardi, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. A parte l'aggiunta di detergenti per allungare la vita del prodotto, la formulazione di Seibert è quella tutt'ora in uso (8,17).

Koch per tutta la vita continuò le ricerche sulla tubercolina sperando di ottenerne un vaccino. Fu insignito del premio Nobel per la Medicina e Fisiologia nel 1905. Il suo enorme merito fu quello di aver rielaborato, con una tenacia e pazienza che hanno dell'incredibile, concetti già acquisiti (trasmissibilità della tubercolosi, tecniche di colorazione e colturali, nozioni di infettivologia) alla ricerca di un germe avente proprietà diverse da tutti gli altri, a cui legò per sempre il suo nome (bacillo di Koch). Villemin, che per primo aveva dimostrato la trasmissibilità della malattia e sostenuto feroci opposizioni da parte della comunità scientifica, soffrì molto nel vedere il suo apporto e quello della Scuola francese pressoché ignorato e sconosciuto (8).

1.21. L'EPIDEMIA

La tubercolosi, a partire probabilmente dai primi del Seicento – nel 1650 era già la principale causa di morte – aumentò drammaticamente in Europa e nel Nord America, divenendo epidemica durante il XVIII e XIX secolo, in coincidenza con la rivoluzione industriale e coinvolgendo, seppur in misura diversa, tutti i ceti sociali: "la grande peste bianca", così denominata per il cadaverico pallore che caratterizza la malattia.

La mortalità era enorme: una morte su quattro, in Inghilterra, alla fine del Settecento era attribuibile a questa malattia. Il "terribile flagello del fiore della gioventù" (59) in Svizzera era responsabile del 39% dei casi di morte in età compresa tra i 20 e i 30 anni; ai primi dell'Ottocento, più di un terzo delle/dei pazienti trattati negli ospedali di Parigi erano tisiaci. Anche in Italia si insediò stabilmente ai primi posti tra le cause di morte, nell'Ottocento e nei primi anni del Novecento. Nel Nord America la tubercolosi, presente dal periodo coloniale, aumentò in seguito alla migrazione dall'Europa, anche in conseguenza delle terribili condizioni del viaggio via mare, e ai primi dell'Ottocento rappresentava la prima causa di morte tra le/gli americani adulti (13, 56, 57).

I.22. LA POLITICA

Mentre la classe medica era impegnata nello studio anatomo-patologico, clinico e patogenetico della tubercolosi, alcuni medici e affiliati al movimento sindacalista rivoluzionario francese di fine Ottocento e inizio Novecento, attenti alle dinamiche della società industriale, posero l'accento sul fatto che la malattia, "ineguale davanti alla morte", era più diffusa e più letale tra le fasce più povere della popolazione (4).

Già l'accademico francese Hermann Pidoux, aveva distinto la "consunzione dei poveri", dovuta a "cause esterne quali deprivazioni di ogni sorta, ignoranza, malnutrizione, lavoro disumano, abitazioni non igieniche", dalla "consunzione dei ricchi", provocata "da cause interne o patologiche quali malattie croniche, pigrizia, lussuria, eccessi alimentari, tormenti ed ambizioni", facendo una proposta senza precedenti, l'istituzione di un network sostenuto da forze governative che individuasse e risolvesse le cause sociali della malattia, progetto che tuttavia non ebbe alcun seguito. Il concetto della tubercolosi come tara ereditaria, tenacemente asserito nella prima metà del secolo, che spiegava il fatto che le classi sociali più povere si ammalassero di più con l'ipotesi che fossero più frequentemente portatrici di difetti ereditari, stava ostacolando non poco la comprensione del ruolo delle condizioni di vita nella genesi della malattia. Non solo, galvanizzata dalla scoperta di Koch, la classe medica accademica e politica identificava la tubercolosi con il bacillo tubercolare, trascurandone altri aspetti; il movimento sindacalista cercò di portare alla giusta proporzione l'enfasi che era data all'importanza dell'esposizione al bacillo. Molti studi, sia di microscopia che autoptici, condotti su lesioni guarite di persone che non avevano mai presentato sintomi di tubercolosi, dimostravano che la maggior parte della popolazione, se non tutta, era esposta al contagio. Vi erano dunque fattori cruciali per lo sviluppo della malattia, individuati dai rivoluzionari in abitazioni sovraffollate e fatiscenti, prive d'acqua potabile e di fognature, alimentazione inadeguata, feroci condizioni di lavoro, assenza di assistenza sanitaria, scarsa ventilazione e illuminazione nelle fabbriche, lavoro femminile e minorile, esposizione a temperature estreme di caldo e di freddo, riposo insufficiente. Erano tali condizioni che non consentivano un adeguato recupero dell'esaurimento fisico e nervoso, dell'"avvelenamento" del corpo conseguente alle condizioni lavorative; la "causa" principale di malattia, più che nell'esposizione al bacillo, era quindi da ricercare nella "diminuita resistenza" della persona (4).

La lotta alla tubercolosi divenne per il movimento operaio sia punto di aggregazione, per attirare adepti, sia obiettivo da conseguire; nei manifesti per la riduzione dell'orario lavorativo, ad esempio, era scritto "Dieci ore di lavoro al giorno hanno in sé il germe della tubercolosi". Karl Heinrich Marx (1818-1883), nella sua opera *Das Kapital*, definì la tubercolosi la conseguenza inevitabile dello sfruttamento dei lavoratori tipico del capitalismo. Sulla stessa linea era Vladimir Ilyich Lenin (1870-1924), artefice della rivoluzione russa dell'ottobre 1917, secondo il quale la lotta alla tubercolosi, "malattia della classe operaia" non era di mera pertinenza medica ma aveva un'accezione più ampia, che includeva la creazione di adeguate condizioni di lavoro, di abitazione, di nutrizione, di riposo, di educazione sanitaria; essa non era da affidare a iniziative private, quali organizzazioni caritatevoli e volontariato, ma doveva essere pianificata in modo organico dallo Stato. Anche la cura sanatoriale era considerata palliativa, in quanto ritornando i lavoratori, uomini e donne, nelle medesime condizioni di vita che avevano favorito lo sviluppo della malattia, erano destinati ad ammalarsi nuovamente.

Un ruolo importante era dato, inoltre, all'organizzazione di un periodo di riposo per le/i lavoratori esausti o i soldati invalidi (61).

Anche se nella politica di sanità pubblica nell'Europa occidentale e nel Nord America nel ventesimo secolo continuò a dominare il concetto di lotta alla tubercolosi inteso come sforzo contro il bacillo tubercolare, *ens morbis*, non mancò tuttavia una medicina, con vocazione socio-politica, attiva nell'organizzare campagne di educazione e di organizzazione igienico-sanitaria volte contro le ragioni sociali della malattia. Il lento declino della tubercolosi, iniziato prima dell'avvento dell'era antibiotica, fu nei fatti probabilmente dovuto, oltre che all'isolamento delle persone tisiche e alla selezione di una popolazione più resistente, anche alle prime applicazioni delle misure di salute pubblica e al miglioramento delle condizioni economiche, di vita, di lavoro e di nutrizione (14).

1.23. LA TUBERCOLOSI BOVINA

Già nell'Ottocento si era supposta una relazione tra tisi e malattia cachettizzante dei bovini; nei primi anni del secolo, alcune osservazioni avevano associato scrofola e disordini dell'apparato gastrointestinale all'assunzione di latte non bollito di vacca; Villemin, nel 1868, aveva inoltre dimostrato la trasmissibilità della tubercolosi bovina agli animali da esperimento. Dopo la scoperta di Koch, sebbene non si fossero condotti specifici studi a riguardo, era opinione generale che l'agente eziologico della malattia sia umana che bovina fosse un identico bacillo con conseguente possibilità di contagio da bestiame a uomo (19, 33).

Nel 1898, Theobald Smith (1859-1934), ricercatore americano, dimostrò che vi erano piccole ma costanti differenze fenotipiche morfologiche e colturali tra il bacillo di origine umana e bovina e differenziò la variante umana da quella bovina, sottolineando il rischio di passaggio della variante bovina all'uomo. La somministrazione di tubercolina assunse, prima nel bestiame che nell'essere umano, significato di test diagnostico, dopo che lavori di Koch ne avevano confermato l'utilità nell'individuazione dei capi infettati. In Gran Bretagna, alla fine dell'Ottocento, ben due Commissioni Reali sottolinearono la pericolosità della tubercolosi bovina per l'uomo e il rischio di contagio mediante l'ingestione di cibo proveniente da bovini ammalati. Si intrapresero, così, misure di politica sanitaria volte a garantire forniture di latte e di carne non contaminati, quali la sorveglianza dei macelli, possibile soprattutto nelle grandi città, e la diffusione della pratica della bollitura del latte. In 17 Stati degli USA, già nel 1900, era richiesta la negatività del test tubercolinico per l'importazione di capi di bestiame (19, 33).

In questo contesto scientifico e politico, nel controverso Congresso Britannico sulla Tubercolosi, tenutosi a Londra nel 1901, Koch prese una netta posizione concludendo che, se pur in seguito a studi limitati, era possibile dedurre che i bacilli di origine bovina e umana erano distinti, che la variante umana non era in grado di causare malattia nei bovini e che era anche vero che la trasmissione della tubercolosi bovina all'essere umano era così rara e improbabile da non rendere necessarie misure di prevenzione in tal senso. Ne seguì un dibattito acceso; la maggior parte degli studiosi, i veterinari rappresentati da Bernhardt Bang (1848-1932), McFadyean e Ravenel e altri, quali Virchow, contestarono l'opinione di Koch, ritenendo che fosse basata su prove non sufficientemente esaurienti e che non fosse stato saggio rendere pubbliche teorie di tale importanza per la popolazione prima che la

questione fosse stata definitivamente chiarita. Il Congresso non prese nessuna decisione conclusiva e, anche in considerazione dell'enorme reputazione di cui godeva Koch, auspicò studi ulteriori (51).

Il governo inglese, con il supporto di Lord Joseph Lister (1827-1912), presidente del Congresso, nominò nel 1901 una Commissione Reale, composta da alcuni tra i più autorevoli microbiologi del Paese, tra i quali Arthur Stanley Griffith (1875-1941) e Frederick Griffith (1877-1941). La questione, a cui aveva dato grande rilievo la stampa, non era puramente accademica e coinvolgeva importanti interessi economici, come il commercio di bovini e l'industria dei latticini (11). La relazione della Commissione, pubblicata nel 1911, gettò le basi scientifiche per la politica di eradicazione della tubercolosi bovina in Gran Bretagna e negli altri Paesi industrializzati, concludendo che il bacillo bovino era in grado di infettare l'uomo e causare malattia clinica, che la più importante fonte di infezione, soprattutto per le/i bambini, era il latte, mentre il rischio di trasmissibilità attraverso le carni era molto più basso di quanto era stato precedentemente supposto. Test alla tubercolina, abbattimento dei capi infettati, pastorizzazione del latte, istituzione di servizi veterinari, risarcimento degli allevatori di bestiame infetto furono i cardini di una tra le più riuscite lotte intraprese contro una malattia infettiva (19, 33).

Il peso dell'opinione scientifica di Koch ritardò comunque notevolmente in Gran Bretagna e in Europa – a differenza degli Stati Uniti – la messa in pratica di misure di controllo efficienti, che ebbe una valida attuazione soltanto negli anni '30. Circa il 6% delle morti per tubercolosi in Gran Bretagna nel 1930 era ancora causato dal bacillo bovino; la graduale introduzione delle misure ridusse il numero di bambine/i con linfadenopatia cervicale tubercolare, dovuta al consumo del latte infetto e all'impianto dei bacilli nelle tonsille o nella faringe, nonché portò alla diminuzione della tubercolosi cronica della cute (*lupus vulgaris*) conseguente alla fistolizzazione linfonodale. Con la quasi scomparsa della tubercolosi bovina in Gran Bretagna verso gli anni '60 l'interessamento cutaneo divenne estremamente raro (33).

Nei primi anni '50, nonostante la pesante opposizione degli allevatori, venne introdotta la pratica della soppressione degli animali positivi alla tubercolina (19). In Italia, il DPR 320/54 riguardante il regolamento di Polizia Veterinaria è alla base di una serie di normative volte all'eradicazione della tubercolosi bovina.

1.24. LA RADIOLOGIA

Un enorme impulso alla diagnostica *in vivo* fu possibile grazie alla rivoluzionaria scoperta, nel 1895, dei raggi X da parte del fisico tedesco Wilhem Roentgen (1845-1923), che gli valse il premio Nobel per la Fisica nel 1901 (49).

La tecnica radiologica fu rapidamente introdotta, soprattutto ad opera del fisico francese Antoine Béclère (1856-1939), pioniere dello screening radiologico sistematico. Il corpo, che si poteva esplorare solo al tavolo autoptico o tramite mezzi indiretti – la percussione e l'auscultazione – divenne così “trasparente”. Le immagini radiologiche permisero una rappresentazione visiva *in vivo* della lesione e la sua localizzazione, lo studio dell'evoluzione delle lesioni, la diagnostica precoce della malattia e l'esecuzione di prelievi biotipici mirati. La reale, e insospettata, incidenza della malattia, venne alla luce. Seguirono continui e progressivi miglioramenti tecnologici, come l'introduzione di fluoroscopia e fotofluorografia. Milioni di persone – popolazione civile e militare, specie nella

seconda guerra mondiale – furono sottoposti a screening sistematico, finché l'uso delle tecniche radiologiche come metodica di individuazione precoce della tubercolosi venne gradualmente abbandonato con il declino della malattia (13, 17).

La fine dell'Ottocento e l'inizio del Novecento videro anche il fiorire di grandi clinici europei, soprattutto della Scuola francese, che con l'ausilio di microbiologia e di radiologia perfezionarono la semeiotica della tubercolosi e ricondussero a un inquadramento clinico unitario lesioni considerate entità clinicamente autonome. Vennero descritti sintomi e segni delle forme extrapolmonari, osteoarticolari, renali, genitali, sierose (pleuriche, peritoneali, pericardiche), meningee, linfonodali. Nomi degni di nota sono Victor André Cornil (1837-1908), Jacques-Joseph Grancher (1843-1907), Louis Landouzy (1845-1917) e più tardi Louis Bard (1857-1930). Progressi furono fatti anche, con l'introduzione delle tecniche di colorazione tessutale ad opera di Paul Ehrlich, in ambito istopatologico, soprattutto grazie a scienziati di lingua tedesca, tra i quali spiccano l'austriaco Anton Ghon (1866-1936) e il tedesco Karl Ernst Ranke (1870-1926) (13).

1.25. LO PNEUMOTORACE

Nel 1882, *annus mirabilis* nella storia della tubercolosi, un fisiologo italiano, Carlo Forlanini (1847-1918) inventò la prima metodica efficace – lo pneumotorace terapeutico – nella cura della tubercolosi, che offrirà speranza e in molti casi effettiva guarigione (52, 70).

Già nel 1696, Giorgio Baglivi (1668-1707) notò miglioramento clinico di un paziente tisico, andato incontro a pneumotorace in seguito a una ferita di spada (17). Fu tuttavia Edmond Claud Bourru (1737-1823), bibliotecario alla Facoltà di Medicina di Parigi, il primo a suggerirne un impiego terapeutico, nel 1771, consigliando di aprire il torace, facendovi entrare aria, finché la guarigione non fosse avvenuta spontaneamente. James Carson (1772-1843), a Liverpool, dopo aver sperimentato la tecnica in animali da esperimento, convinse nel 1822 il suo collega chirurgo Henry Birckersteth a provocare lo pneumotorace in due pazienti, ma non fu possibile realizzarlo per l'adesione dei foglietti pleurici e la comparsa di empiema, e in seguito l'idea fu abbandonata. Pierre Adolphe Piorry (1794-1879), negli stessi anni, per determinare il riavvicinamento e la cicatrizzazione delle caverne tubercolari, ideò un metodo che consisteva nell'applicare fasce di compressione e pesi sul torace malato. Nel 1885, William Cayeley, a Londra, fece introdurre con successo dal chirurgo Pearce Gould (1852-1922) un tubo nella cavità pleurica per controllare una severa emottisi. L'introduzione di aria sterilizzata nel cavo pleurico con conseguente collasso polmonare, ad opera di Claude Potain, in Francia, esitò in un miglioramento clinico. Furono in seguito pubblicati articoli di autori francesi (Toussaint, 1880, Herard e Meusnier, 1881) che riportavano come casi di pneumotorace spontaneo, idropneumotorace o versamento pleurico avessero favorito il decorso della malattia, portando a cicatrizzazione delle lesioni cavitari (52, 70).

In seguito alla lettura di tali articoli, non essendo a conoscenza del lavoro di Carson, che fu reso noto solo nel 1909, Forlanini, nel 1882, pubblicò piccoli saggi in cui proponeva di provocare a scopo terapeutico uno pneumotorace artificiale. La sua idea si basava su un concetto fisiopatologico eminentemente meccanico della tubercolosi secondo cui il danno maggiore era dovuto al costante trauma sul tessuto elastico polmonare operato dalle trazioni inspiratorie della gabbia toracica. Provocando uno pneumotorace per un periodo prolungato, anche di anni, si sarebbero così venute

a creare immobilità e “riposo” del polmone e del processo tisiogeno, che avrebbero favorito i normali processi di riparazione e cicatrizzazione tessutali; si sarebbe poi gradualmente proceduto alla riespansione polmonare (“abbandono dello pneumotorace”) quando si fosse ottenuta la guarigione. Facendosi aiutare dal fratello Enrico (1848-1930), brillante ingegnere, mise a punto un prototipo di apparecchio ed eseguì il primo pneumotorace nel 1888. Forlanini perseguì con tenacia il suo progetto perfezionando l'apparecchiatura, fra l'indifferenza e l'ostilità dei colleghi italiani (fig. 1.13). Christian Saugman, (1864-1923), medico danese, migliorò la tecnica aggiungendo un manometro ad acqua all'apparecchio, che permetteva di verificare che l'ago fosse penetrato correttamente nella cavità pleurica; la procedura divenne in tal modo semplice e routinaria. John Benjamin Murphy (1857-1916), chirurgo di Chicago, in base all'osservazione che i reduci della guerra civile con esiti di pneumotorace avevano raramente difficoltà respiratorie, provocò uno pneumotorace artificiale, secondo una tecnica messa a punto in modo del tutto indipendente da Forlanini, pubblicandone i risultati nel 1898. Tale intervento fu il primo nella storia ad essere seguito con i raggi X. Vi furono contrasti sulla paternità dell'invenzione, che venne in seguito attribuita universalmente a Forlanini. Nel 1912, Maurizio Ascoli (1876-1958) ideò lo pneumotorace ipotensivo o a bassa pressione, che provocando non un'immobilità assoluta del polmone, ma una semplice riduzione delle escursioni respiratorie, poteva essere attuato nelle forme di tubercolosi bilaterale. La sua applicazione pratica incontrò inizialmente la diffidenza del mondo medico, tanto da essere apprezzata e messa in pratica soltanto circa venti anni più tardi. La relazione di Forlanini e dei suoi sostenitori della scuola francese (Brauer) e tedesca (Dumarest), al VII Congresso Internazionale sulla Tubercolosi, nel 1912, segnarono la definitiva consacrazione ufficiale del metodo e del suo inventore. L'entusiasmo fu tale che lo stesso Forlanini fece appello contro l'uso inappropriato e indiscriminato della tecnica da lui definita “una terapia aristocratica”, da eseguirsi solamente in casi selezionati. Il metodo fu largamente diffuso in Italia, soprattutto ad opera di Eugenio Morelli (1881-1960), allievo di Forlanini, e in Europa e negli Stati Uniti (70).

Nonostante tragici incidenti (come lo svuotamento delle lesioni caseose polmonari nel cavo pleurico, pleuriti croniche e ricorrenti, perdite di funzioni permanenti del polmone collassato), l'innovazione portò effettivamente in molti casi a un rapido miglioramento di tosse ed emottisi e anche a guarigione. Lo pneumotorace fu la prima reale prova della possibilità di un'evoluzione positiva nel trattamento antitubercolare (13, 52, 70).

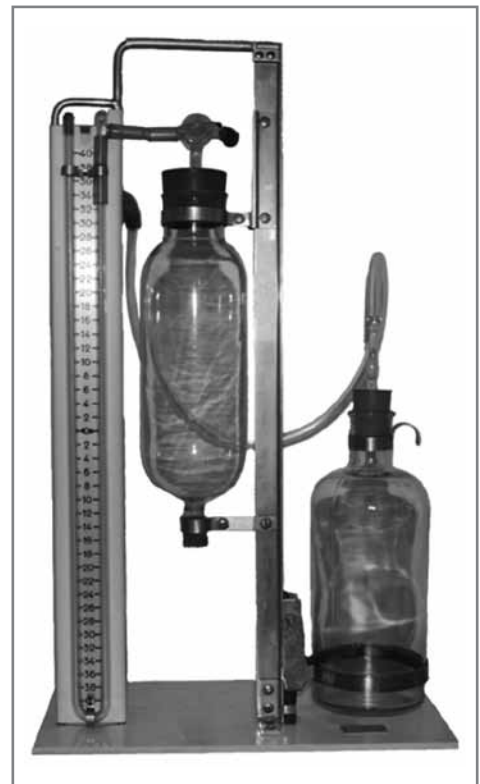


Fig. 1.13 - APPARECCHIO DI FORLANINI PER L'INDUZIONE DELLO PNEUMOTORACE, 1892.

I.26. LA CHIRURGIA TORACICA

La terapia chirurgica permise il trattamento anche nei casi in cui, a seguito di estese aderenze tra il foglietto pleurico viscerale e quello parietale, era impossibile l'esecuzione dello pneumotorace.

Per poterle sezionare, il medico svedese Hans Christian Jacobaeus (1879-1937) perfezionò la tecnica di "pleurolisi intrapleurica" nel 1922, dopo i primi approcci fatti dal chirurgo tedesco Ernst Ferdinand Sauerbruch (1875-1951) e da Friedrich. L'operazione, lunga e dolorosa, veniva condotta con l'ausilio del toracoscopio, da poco inventato, che permetteva una visione intraoperatoria. Per evitare un'operazione così complessa e delicata si pensò di creare una tasca artificiale extrapleurica, in cui veniva introdotta aria, attraverso lo scollamento della pleura parietale dalla parete muscolare e ossea toracica; lo "pneumotorace extrapleurico", preconizzato dalla Scuola Romana di Attilio Omodeo Zorini (1897-1983), fu messo tecnicamente a punto in Germania nel 1935. Nel "piombaggio extrapleurico muscolo-periosteale", realizzato da Baer nel 1933, era prevista l'introduzione di materiali solidi inerti e leggeri (resine acriliche, sfere di leucite, cera di paraffina) per mantenere il collasso polmonare; nell'oleotorace, al posto dell'aria, veniva immesso olio d'oliva (13, 40, 52).

Fu attuata, a fini terapeutici, anche l'interruzione del nervo frenico, aggredibile nella regione del collo – tramite sezione (frenicotomia), strappamento del moncone (frenico-exeresi proposta nel 1911 da Stuertz) o alcolizzazione – che, provocando la paralisi della metà omologa del diaframma e la sua risalita nella cavità toracica, determinava minore mobilità e possibilità di espansione del polmone malato. Vi erano tuttavia gravi effetti sulla funzione respiratoria, con la soppressione della ventilazione soprattutto delle basi polmonari, le più efficienti e importanti per l'ossigenazione. Per ovviare all'irreversibilità delle conseguenze, fu introdotto in larga scala lo schiacciamento chirurgico o la frammentazione del nervo che provocava paralisi temporanea (frenofrasi) per un periodo di circa sei mesi, a cui era associato pneumoperitoneo artificiale, mediante insufflazione di gas o aria nella cavità peritoneale, con ulteriore inibizione della motilità del diaframma e del lobo inferiore del polmone. Per le lesioni apicali, fu proposto da Luigi Condorelli (1899-1985) lo pneumomediastino terapeutico (13, 40, 52).

La chirurgia tentò di provocare il collasso polmonare anche con metodi aggressivi e demolitivi. La toracoplastica, tecnica di asportazione parziale di una serie di coste, in seguito alla quale la parete toracica si affloscia e si "plasma" sulla faccia esterna del polmone, collassatosi in seguito all'apertura della cassa toracica, fu introdotta per la prima volta dallo svizzero Edouard De Cérenville (1843-1915). La metodica aveva il vantaggio che, non interessando lo spazio pleurico, non poteva causare un'empima tubercolare. Nel 1907, Ludolf Brauer (1865-1951) e Friedrich, chirurghi tedeschi, attuarono la "pleuro-pneumolisi totale toraco-plastica", con ampie resezioni costali estese a quasi tutta la parete laterale di un emitorace. Tali tecniche furono ben presto abbandonate per la gravissima mutilazione che ne conseguiva. Sauerbruch ridusse la larga asportazione costale a una resezione parziale, limitandola ai segmenti paravertebrali di tutto l'emitorace.

Innumerevoli varianti di toracoplastica furono poi proposte e praticate, con variabili riguardanti il numero di coste e l'estensione di resezione di ciascuna costa. Si imposero negli anni '20 le resezioni parziali, che limitavano l'entità del collasso al solo distretto polmonare effettivamente colpito da lesione. In considerazione del fatto che la tubercolosi colpiva prevalentemente i lobi superiori, i francesi Bernau e Fruchaud proposero, nel 1926, la toracoplastica postero-superiore o apico-dorsale,

limitando la resezione alle arcate costali superiori fino alla quinta costa. Tale tecnica venne in seguito migliorata dal norvegese Carl Semb (1895-1971) che introdusse la disinserzione della cupola pleurica (apicolisi extrafasciale) che provocava il collasso del lobo superiore. Queste toracoplastiche parziali, sottoposte a continuo perfezionamento tecnico, costituirono anche dopo la seconda guerra mondiale, in epoca ormai antibiotica, l'intervento chirurgico di maggiore interesse, con larga applicazione e anche buoni risultati, mentre le altre metodiche vennero abbandonate (13, 40, 52).

L'antibiototerapia paradossalmente fece ritornare in auge il trattamento chirurgico, gravato in precedenza da disseminazioni dell'infezione tubercolare e alta mortalità, dal momento che permetteva di preparare i pazienti all'intervento e di prevenirne le complicanze. Edward Delos Churchill (1895-1972), americano, e Robert Klostock (1899-1972), un ebreo ungherese emigrato in America, introdussero la lobectomia superiore nel 1943. Successivamente, nel 1946, grazie alla delucidazione dell'anatomia broncopolmonare da parte di Brock, a Londra, fu possibile eseguire la segmentectomia polmonare nelle aree tubercolotiche. Tra tutti gli storici interventi, gli unici ancora utilizzati intorno agli anni '60 erano le toracoplastiche parziali, le lobectomie e le resezioni segmentarie. Il solo intervento praticato oggi rimane la "decorticazione pleurica" in associazione talvolta alla toracoplastica postero-superiore o apico-dorsale. Con l'instaurarsi, per la cura della tubercolosi – come non era mai successo nella storia della medicina –, di una stretta collaborazione tra clinico e chirurgo si crearono i presupposti per la formazione di équipes di specialisti. La terapia chirurgica perse la sua egemonia soltanto quando, in seguito a numerose conferme istologiche e batteriologiche, si dimostrò che la terapia antibiotica da sola era in grado di guarire la tubercolosi, concetto accolto con molto scetticismo al suo apparire. Il contributo della chirurgia nella tubercolosi è stato considerevole, difficile, tuttavia, stabilire il suo reale valore nel ridurre la mortalità (13, 52).

Un'ultima considerazione riguarda la sofferenza, oggi giorno inimmaginabile, che malati/e dovettero sopportare sottoponendosi a tali pratiche chirurgiche, spesso di lunga durata, dolorose, deturpanti e di esito incerto. È intuibile quale rivoluzione rappresenterà l'introduzione della terapia antibiotica (13).

1.27. IL VACCINO

Nella seconda metà dell'Ottocento, Louis Pasteur (1822-1895) lavorava all'attenuazione della virulenza di batteri vivi, nel tentativo di creare un "vaccino", così da lui denominato in onore del suo collega inglese Edward Jenner (1749-1823), che per primo nel 1796 aveva inoculato in un bambino pus del vaiolo vaccino, che colpiva i bovini (49).

Sulla scia della geniale intuizione, numerosi furono i tentativi di mettere a punto un vaccino efficace contro la tubercolosi. Si scelsero, come punto di partenza, non i componenti inattivati del bacillo tubercolare, vista l'inefficacia terapeutica della tubercolina, ma bacilli attenuati o morti di varie specie (equina, bovina, umana), in accordo ai principi di Pasteur. Il primo vaccino a mostrare protezione contro la tubercolosi fu messo a punto da Behring, nel 1902; denominato "bovo-vaccino", era costituito da bacillo tubercolare umano invecchiato per più di sei anni ed essiccato sottovuoto. La risposta tuttavia era transitoria e l'attenuazione non era stabile nel tempo. Anche lo stesso Koch mise a punto un vaccino, usando ceppi attenuati sia umani che bovini, chiamato "tauruman", che pur-

troppo mostrò le stesse problematiche e gli stessi limiti del vaccino di Behring (63). Tra i tentativi vi fu quello italiano di Edoardo Maragliano (1849-1940) del 1903, che ideò e produsse un vaccino costituito da un'emulsione di bacilli morti, accompagnato da una sieroterapia con siero di animali vaccinati; perfezionato da Giovanni Petragliani (1893-1969) e da Gaetano Salvioli (1894-1982), fu usato con scarsa efficacia solo in Italia e mai riconosciuto all'estero (14).

Nel 1895, Leon Charles Albert Calmette (1863-1933), fondatore e direttore del secondo Istituto Pasteur Europeo, a Lille (il primo era quello di Parigi), iniziò ad occuparsi di tubercolosi. Per avvalersi di competenze di veterinaria, indispensabili per gli studi sperimentali sugli animali, nel 1897 strinse una collaborazione, durata 36 anni, con Camille Guérin (1872-1961), un giovane chirurgo veterinario, che gli era stato segnalato da Edmond Nocard (1850-1903), un allievo di Pasteur. Una delle più interessanti osservazioni dei due studiosi fu che un ceppo di tubercolosi equina, poco virulento, somministrato per via orale a una cavia era in grado di produrre protezione verso il ceppo virulento. Per questo motivo, le loro ricerche si indirizzarono verso un vaccino da somministrare per os, che potesse attraversare la barriera intestinale e diffondersi per via linfatica all'intero organismo. Nel 1904, iniziarono a coltivare un ceppo isolato da una mastite tubercolare bovina su una patata glicerinata a cui, per favorirne l'omogeneizzazione, indispensabile per l'assorbimento intestinale, aggiunsero bile sterile. Successivi passaggi nel *medium* al 21° giorno di coltura portarono, dopo un'iniziale recrudescenza della virulenza, a progressive modificazioni di morfologia e attenuazione della virulenza, tanto che al 39° passaggio il ceppo aveva perduto la sua capacità di uccidere animali. Tale scoperta fu presentata nel 1908 all'Accademia delle Scienze: l'isolamento di una "nuova specie di bacillo tubercolare biliato che manteneva stabilmente l'attenuazione della virulenza, pur conservando l'antigenicità". Il bacillo, denominato in origine "bacillo tubercolare biliato", divenne poi "bacillo biliato Calmette-Guérin" ed infine "bacillo Calmette-Guérin o BCG". Il ceppo, sottoposto a 230 passaggi nel *medium* a base di patata biliata, mantenne l'attenuazione della virulenza e, testato su differenti specie di animali (cavie, conigli, cavalli, mucche, scimmie, scimpanzé), si dimostrò incapace di causare tubercolosi progressiva fatale. Studi successivi dimostrarono che la malattia prodotta da tale bacillo era autolimitante nel tempo e che esso induceva una parziale resistenza, a 30 giorni dalla vaccinazione, alla reinfezione con ceppi virulenti di bacillo tubercolare bovino e umano (63).

Tra la scoperta del BCG e la prima somministrazione come vaccino sull'uomo passarono tredici anni. La prima guerra mondiale causò un rallentamento delle ricerche; con l'occupazione germanica di Lille, nel corso di una serie di esperimenti, i bovini infettati sperimentalmente dovettero essere sottoposti prematuramente ad autopsia per evitare che venissero requisiti e destinati all'alimentazione dalle truppe tedesche; la moglie di Calmette, inoltre, insieme con altre ventiquattro donne, fu tenuta in ostaggio per quattro mesi nei pressi di Hannover. Calmette, divenuto direttore dell'Istituto Pasteur di Parigi nel 1919, continuò la collaborazione con Guérin rimasto a Lille (63).

Nel 1921, dopo che era stata dimostrata la sicurezza del BCG sugli animali, il vaccino venne sperimentato per la prima volta su un bambino nato da una donna morente di tubercolosi; gli venne somministrata una piccola quantità di BCG, per via orale, nei primi giorni di vita, incrementandone progressivamente la dose. Il bimbo, affidato alla nonna tistica, non sviluppò tubercolosi. Dopo ulteriori dimostrazioni che la vaccinazione proteggeva i contatti di pazienti affetti da tubercolosi, l'uso del vaccino si diffuse velocemente in Francia e nella maggior parte dell'Europa. Nei sette anni successivi

furono vaccinati più di 100.000 bambine/i, compresi i figli di Calmette. Uno studio del 1926 dimostrò che la mortalità fra le/i bambine/i vaccinati, contatti di pazienti con tubercolosi, era dell'1,8%, rispetto a quella superiore al 25% tra i non vaccinati. Nel 1928, alla Conferenza della Lega delle Nazioni a Parigi, si affermò che il vaccino era riconosciuto come sicuro e che forniva un certo grado di protezione contro le forme gravi di tubercolosi; il suo uso veniva pertanto incoraggiato. L'anno seguente, tuttavia, a Lubeca, in Germania, dopo la somministrazione di BCG prodotto all'Istituto Pasteur di Parigi a 252 bambine/i, molti di essi si ammalarono di tubercolosi e 72 morirono entro un anno per le conseguenze della malattia. Vi fu un'inchiesta giudiziaria che appurò che il ceppo proveniente dall'Istituto Pasteur era stato scambiato in laboratorio, in Germania, con un ceppo virulento di *Mycobacterium tuberculosis*; si riuscì a distinguere i due ceppi in base alla morfologia delle colonie e alla diversa virulenza nella cavia. Calmette morì pochi anni dopo, nel 1933, provato dal prolungarsi della diatriba legale legata all'incidente. Nonostante che fosse stato inconfutabilmente provato che il vaccino non era responsabile dell'avvenuto, il suo uso diminuì progressivamente negli anni per essere ripreso senza diffidenza soltanto dopo la seconda guerra mondiale, in seguito alla recrudescenza dell'epidemia tubercolare. L'Inghilterra rimase un'eccezione rispetto al resto dell'Europa e non utilizzò il vaccino su larga scala, finché uno studio degli anni '50 ne confermò l'efficacia. Nel 1948 venne indetto all'Istituto Pasteur il "Primo Congresso Internazionale sul BCG", presieduto da Guérin (63).

Durante gli anni '60, la somministrazione per via orale fu sospesa nella maggior parte dei Paesi, perché suscitava una ipersensibilità di tipo ritardato piuttosto lieve ed effimera ed era causa di linfadeniti cervicali. Si preferirono inoculazioni parenterali, quali la scarificazione cutanea secondo Bretey, la puntura multipla secondo Rosenthal, l'anello secondo Merieux. La via intradermica fu preferita, in quanto richiedeva una dose minima di BCG per indurre una risposta immunitaria durevole. Attualmente sembra rinato un interesse per la vaccinazione orale, caratterizzata da maggior semplicità di somministrazione, più bassi costi e induzione di immunità a livello delle mucose, riconosciuta recentemente come un'importante componente dell'immunità antimicobatterica (63).

Il BCG è stato somministrato a un numero incalcolabile di persone in tutto il mondo, risultando uno dei vaccini più usati e più sicuri, con l'unica eccezione dei pazienti immunodepressi, in cui può causare una malattia generalizzata. Il suo ruolo nell'efficacia è stato soggetto di continue controversie. Il BCG sembra essere utile, soprattutto nei bambini, per prevenire le forme più severe di tubercolosi, come la miliare e la meningea. Dagli anni '60 il BCG viene utilizzato come immunomodulatore, specialmente nell'immunoterapia del carcinoma della vescica (63).

A partire dagli anni '20, il BCG fu distribuito in tutto il mondo e i vari Paesi ne mantengono la vitalità attraverso passaggi sui terreni di coltura; si sono venuti così a creare dei sottotipi. Il primo ceppo riconosciuto differente da quello originale è il ceppo Copenaghen, segnalato nel 1948. Sono attualmente in corso studi per definire il significato delle differenze di morfologia, di virulenza e di capacità di indurre immunità dei vari sottotipi di BCG (63).

1.28. I SANATORI

La tubercolosi è da sempre legata al concetto stesso del viaggiare, più di qualsiasi altra malattia; in epoca romantica la/il tisico era considerato un "vagabondo", in incessante ricerca di un luogo

salubre. Il “cambiamento d’aria” fu uno dei cardini terapeutici fin dall’antichità; i Greci consigliavano pellegrinaggi ai templi degli dèi e delle dee, situati spesso in località salubri, i Romani viaggi in località marine calde e asciutte. James Clark (1788-1870), illustre medico inglese, annotava nel 1830: “Un viaggio è innegabilmente di beneficio nei primi stadi della tisi”. Le località climatiche ritenute adatte furono la riviera francese nel Settecento e, dalla prima metà dell’Ottocento, l’Italia centrale e meridionale (Pisa, Roma, Napoli, Sorrento, l’isola di Ischia) e la riviera ligure. Nacque la climatologia, scienza che esaminava in dettaglio i climi delle varie località in relazione al beneficio per le persone tisiche (44).

Reduce da un viaggio sull’Himalaya, consigliatogli dal suo medico, Hermann Brehmer (1826-1889), uno studente di botanica tisico, tornò guarito “dall’aria pura dell’alta montagna” e nel 1854, in un mondo scientifico che considerava la tisi incurabile, presentò la sua tesi di laurea in medicina dal titolo “*Tuberculosis primis in stadiis semper curabilis*”: in un luogo salubre, e con una sana alimentazione, era possibile guarire. Dando seguito pratico alla sua teoria, nel 1859 fondò il primo sanatorio (dal latino, edificio in cui si sana) privato, a Goerberdorf, nella regione dei Sudeti, in Slesia, a 560 metri sul livello del mare. La proposta di George Bodington (1799-1882), nel 1840, di destinare edifici salubri, in luoghi soleggiati, alle persone ammalate di tubercolosi, non aveva avuto seguito in Gran Bretagna ed è in Germania che il sistema dei sanatori ebbe origine (40).

Già nell’antico Egitto esistevano edifici in cui le persone si immergevano in acque sacre per ottenere la guarigione. Il tempio di Deir-el-Bahri (XVIII dinastia, 1500 a.C.), in cui pazienti provenienti da diversi Paesi sostavano appoggiate/i alle colonne, attendendo la guarigione, è ritenuto da Milne Joseph Grafton (1867-1951) il primo sanatorio della storia (48).

Il sanatorio, alla sua origine, fu privilegio delle classi sociali abbienti, strettamente legato all’idea di turismo, come alternativa ai soggiorni in località marine prescritti durante tutto l’Ottocento nel Sud Europa. Non a caso i sanatori più prestigiosi erano situati in località turistiche scistiche famosissime, in particolare in Svizzera, Paese con solida tradizione di turismo; l’Hotel Quisisana, ancora oggi grande albergo di lusso a Capri, fu fondato dal medico inglese George Sidney Smith Clark (1819-1868) come piccolo sanatorio (13, 44). Solo successivamente, per iniziative filantropiche, nacquero sanatori per la cura gratuita delle/dei non abbienti. Già nel 1874 nel sanatorio di Goerberdorf era prevista una sezione per persone appartenenti al ceto popolare. In Italia, Giuseppe Barellai (1813-1884), medico toscano, diede vita a un’organizzazione improntata alla solidarietà sociale fondando a Viareggio, nel 1862, il primo ospizio per bambine/i scrofolosi (67).

Con il diffondersi della consapevolezza della contagiosità della malattia, le caratteristiche originali dei sanatori non tardarono a modificarsi: non essendo gli ospedali in grado di seguire una malattia così diffusa e con decorso così prolungato e non potendosi attuare in breve tempo misure efficaci di prevenzione, si propose la creazione di stabilimenti per degenza di lungo periodo, per isolare il paziente e proteggere la comunità (13).

Fu la Germania, dopo Koch, a guidare in Europa l’adeguamento della normativa sanitaria alla moderna visione scientifica. Già nel 1883 fu introdotta in Germania un’assicurazione che copriva sei mesi (e successivamente periodi più lunghi) di malattia. In Gran Bretagna, nel 1910, furono creati sanatori pubblici per le classi operaie e dall’anno successivo venne istituito un sostegno economico (indennità da sanatorio) per le/i malati; in Italia, nel 1927, fu creata una copertura assicurativa specifica per la tubercolosi, di cui usufruì circa la metà della popolazione. Nel 1889 a Boston, la Società

americana riconosceva che la miglior opportunità di cura contro la tubercolosi era il sanatorio, posizione ribadita l'anno dopo a Berlino al 10° Congresso Internazionale di Medicina Interna (67).

Il sistema dei sanatori si sviluppò presto, in tutti Paesi: in Germania, famosissimi, Falkenstein, Hohenhonnef, Ruppenshain, Harz, Foresta Nera; in Svizzera, Davos, Arosa, Leysin, Heiligen-Schwendi; in Francia, Durtol, Arcachon, Hauterville, Angicourt, Menton; e così via in Austria, in Norvegia e in Inghilterra. Nell'America del Nord, un giovane medico, malato egli stesso di tubercolosi, Edward Livingston Trudeau (1848-1915), fondò nel 1884 il più famoso sanatorio degli Stati Uniti, l'Adirondack Cottage Sanitarium, a Saranac Lake, nello Stato di New York (40). Il primo sanatorio italiano fu realizzato nel 1901, per iniziativa di Ausonio Zubiani (1869-1921), presso Sondalo, a Pineta di Sortenna, nell'alta Valtellina, a 1240 metri sul livello del mare, in uno stupendo scenario alpino. Successivamente, i sanatori si moltiplicarono su tutto il territorio nazionale, in pianura, in collina, in alta montagna e in località di mare e di lago. Furono istituite inoltre numerose "colonie post-sanatoriali" di convalescenza prima del reintegro della/del paziente nel proprio ambiente. Il clima e la bellezza della natura, ritenuti valori terapeutici, erano considerati fondamentali per la scelta del luogo (13, 14).

Il grandioso apparato di edilizia sanitaria si avvale dei migliori architetti, che collaborarono a stretto contatto con gli pneumotisiologi, per progettarne i minimi dettagli. Serramenti, superfici, arredi, verande, balconi, finestre furono curati con minuziosa attenzione all'ergonomia e all'igiene, in modo da privilegiare al massimo l'esposizione al sole e i ricambi d'aria. Furono indetti concorsi per abbinarne bellezza e razionalità. Speciali chioschi appoggiati su una base rotante, per poter essere orientati secondo i movimenti del sole, erano diffusi in Gran Bretagna in epoca vittoriana; tra gli stabilimenti più rinomati per l'elioterapia, la clinica svizzera di Collier at Leysin. Interessantissimo, il sanatorio di Paimo progettato dall'architetto finlandese Alvar Aalto (1898-1976) e dalla moglie Aino nel 1928; fu studiato nei minimi particolari, ad esempio il colore del soffitto doveva essere particolarmente attraente, essendo la parte della stanza più a lungo osservata dalla/l paziente allettato. Nello stesso anno, Jan Duiker (1890-1935) inaugurò il sanatorio Zonnenstraal (Raggio di sole), in Olanda, in cui erano raffigurati, in modo straordinario, il mito della natura, il culto della luce, il senso della comunità. Le sedie a sdraio e altri mobili destinati ai sanatori furono disegnati da prestigiosi designer come Charles Edouard Jeanneret (Le Corbusier, 1887-1965). In Italia, nel territorio di Sondalo, la concentrazione di diverse strutture sanatoriali permise di seguire l'evoluzione stilistica dell'architettura (liberty, déco, razionalismo) (12, 65, 77).

Il più grande sanatorio d'Europa, il "Villaggio sanatoriale Morelli", un capolavoro architettonico e paesaggistico incastonato in un imponente ambiente montano a Sondalo, fu voluto dal pneumotisiologo Eugenio Morelli, alto consulente per l'organizzazione antitubercolare dell'Istituto Nazionale Fascista di Previdenza Sociale (fig. 1.14). Composto da nove padiglioni collegati tra loro tramite arcate, muraglioni, scalinate di pietra, ciascuno in grado di ospitare trecento ammalati/e, e dotato di parchi, giardini pensili, terrazze fiorite, fu progettato secondo le soluzioni tecniche ed artistiche più innovative dell'epoca e costruito tra il 1932 e il 1940. Concepito come una cittadella autosufficiente, disponeva in proprio di approvvigionamento energetico e idrico, di trasporti interni, strutture amministrative, religiose, ricreative (65).

Balconi e terrazze divennero più avanti design di moda da imitare nella progettazione degli edifici di città in rapida espansione, come Berlino e Parigi. La più recente storiografia colloca proprio



Fig. 1.14 - VILLAGGIO SANATORIALE MORELLI IN COSTRUZIONE.



Fig. 1.15 - ELIOTERAPIA IN SANATORIO NELLA REGIONE DI ODESSA, ANNI '30. FOTO DI G. LUBARSKIJ.

l'architettura sanatoriale all'origine della moderna architettura, in una simbolica combinazione di aria, luce e salute (9).

Uno dei cardini terapeutici del sanatorio, oltre l'abbondante e ricca alimentazione, era il riposo, che consentiva una respirazione più tranquilla senza dispersione di energie necessarie per la difesa contro la malattia. Le modalità variavano da una immobilità pressoché assoluta (*strict bed*, secondo la terminologia anglosassone) a un riposo rigorosamente regolamentato; tipica la cura d'aria, della durata minima di due ore, eseguita su sedie a sdraio, in verande opportunamente esposte al sole e riparate dai venti, in assoluto silenzio; erano permesse soltanto la lettura e limitate attività manuali (disegno, cucito, ricamo). L'alternanza di riposo e di moto moderato, quale ad esempio la passeggiata all'aria aperta su percorsi non faticosi, o modico lavoro, era regolata da norme e orari precisi (13, 52). Un importante valore veniva attribuito all'elioterapia, secondo un concetto già introdotto da Plinio il Vecchio, "*Sol est remedium maximum*". Il ruolo terapeutico della luce intensa già studiato dal danese Niel Finsen (1860-1904), premio Nobel per la Medicina nel 1906, fu introdotto per la prima volta come cura antitubercolare da Antonino Sciascia (1889-1925) (fig. 1.15) (42, 67).

Con l'avvento dei primi provvedimenti terapeutici (pneumotorace e terapia chirurgica), l'originale vocazione di pace e di riposo non tardò a mutare, e il sanatorio divenne un centro specializzato di esperti di tubercolosi (clinici, chirurghi, radiologi, patologi), nettamente distinto dalle comuni strutture ospedaliere, finalizzato in

modo assolutamente autonomo alla salvaguardia della salute sia psichica che fisica della/ paziente tubercolotico (13).

Nei sanatori vigeva la rigida disciplina introdotta nel 1876 dal medico militare prussiano Peter Dettweiler (1837-1904), uno dei pazienti prediletti di Brehmer, divenuto fondatore di un sanatorio a Falkestein, che presentava alcune analogie con quella delle strutture manicomiali e carcerarie, anche se le/i pazienti non perdevano i loro diritti civili (40). Uomini e donne vivevano separati, potendosi incontrare soltanto durante i pasti. La posta veniva sottoposta a censura per non creare agitazione. Le visite dei parenti erano condizionate al parere dei medici; erano necessari autorizzazioni e permessi per uscire dal perimetro del sanatorio; alcol e, in alcuni sanatori, anche tabacco erano proibiti. I medici potevano attuare a loro discrezione terapie che andavano dalla semplice osservazione ai più audaci interventi chirurgici. Alle/agli ospiti del sanatorio, ammesse/i per un tempo indefinito, venivano richiesti docilità di carattere (uno dei criteri di ammissione al sanatorio), subordinazione, ubbidienza, rinuncia alla propria libera volontà; le persone indesiderate erano allontanate bruscamente e, se povere, non trovando altro ricovero a causa della loro reputazione, avevano preclusa ogni possibilità di terapia. L'adattamento a questo microcosmo chiuso, monotono, rigidamente regolamentato, privo di spazi liberi, dipendeva molto dall'attitudine e dal carattere della persona. Alcuni/e amavano tale mondo, la solitudine, il contemplare, per mesi, il candore delle montagne innevate o il variare del colore del mare e ne traevano ispirazione per la riflessione, l'introspezione, la consapevolezza di sé. Altri/e trovavano intollerabili la lunga immobilità del riposo, il distacco dalla propria famiglia, l'impossibilità di lavorare, la segregazione sessuale. Non tardarono ad emergere soprattutto tra le donne e gli uomini giovani, coloro che invitavano alla disobbedienza e a comportamenti sessuali liberi e disinibiti (13, 29).

Le differenze di ceto si riproponevano anche all'interno della struttura sanatoriale. Per le/i pazienti poveri significava lasciare la famiglia nella miseria, un lungo periodo di isolamento e, in caso di guarigione, un difficile reinserimento nella vita lavorativa. Per le/gli abbienti la tubercolosi era anche una vita di lusso e di ozio; tale archetipo di vita fu descritto, nel 1924, da Thomas Mann nel capolavoro che gli valse il premio Nobel per la Letteratura, *Der Zauberberg (La montagna incantata)*, "dovunque luce e pulizia... aria rarefatta, priva di profumo, di umidità... coperte di lana di cammello... coppe di marmellate e di miele... stetoscopi d'avorio". Il romanzo prende spunto dalla vita nel lussuoso sanatorio di Davos, in Svizzera, in cui la moglie dello scrittore era stata ricoverata, e descrive il microcosmo sanatoriale, dove il protagonista Hans Castorp, giunto in visita a un cugino ammalato di tubercolosi, viene riconosciuto anch'esso malato e ricoverato per un periodo di sette anni. Sono evidenti nel romanzo tutti gli archetipi della romanticizzazione della tubercolosi nell'Ottocento. Altre interessanti biografie della vita in sanatorio, con stili molto differenti, sono quelle di Betty Mac Donald (1908-1958) e Mazo de la Roche (1879-1961) in Nord America, di Beatrice Harraden (1864-1936) in Gran Bretagna, di Michel Corday (1870-1937) in Francia (13, 14).

Nonostante la moltiplicazione di sanatori in tutta Europa e in America del Nord, la cura sanatoriale rimase comunque una terapia per poche/i, data l'enorme diffusione dell'epidemia tubercolare. Non mancarono a tal senso le critiche, specie da parte del sindacato francese, che sosteneva che la ingente quantità di denaro impiegata per l'edilizia sanatoriale avrebbe potuto essere investita con maggior profitto in prevenzione, per migliorare le condizioni di vita della popolazione (4).

Nonostante l'imponente apparato sanatoriale abbia rappresentato uno dei capisaldi della lotta alla tubercolosi per almeno un secolo, non vi è nessuna evidenza scientifica che abbia ridotto il tributo di morte della malattia. Alcuni studi hanno segnalato un importante beneficio nella fase precoce della malattia, non negli stadi avanzati. Secondo statistiche americane, oltre il 60% dei pazienti morivano entro sei anni dalla dimissione, e il tasso di guarigione nel sanatorio dello Stato di New York non differiva di molto da quello spontaneo nella popolazione generale (17, 29). Sicuramente il sanatorio rappresentò, oltre che speranza di miglioramento e guarigione, anche luogo di morte, in solitudine, lontano dalla propria vita e dai propri affetti.

Dopo un lento declino in seguito all'introduzione dei primi farmaci antitubercolari, i sanatori incominciarono ad essere dismessi verso gli anni '60, rimanendo, nella memoria, avvolti di mistero e leggende.

1.29. LE ORGANIZZAZIONI ANTITUBERCOLARI

Le numerose iniziative da parte di movimenti religiosi e di volontariato, volte a migliorare le condizioni igienico-sanitarie della popolazione, si intensificarono dopo la scoperta di Koch, affiancate dal sostegno degli studiosi e dagli interventi dello Stato (67).

Vennero adottati provvedimenti per l'isolamento delle persone tisiche, si produssero sputacchiere tascabili (*Blue Henry*, nella dizione popolare anglosassone), fu introdotto l'obbligo di notifica, vennero creati dispensari, colonie e sanatori, normative specifiche per i luoghi di lavoro. L'esame

microscopico dell'escreato e la schermografia furono utilizzati di routine e fu messa in moto una massiccia campagna di informazione di norme comportamentali, tramite manifesti e stampa (fig. 1.16) (40). Alcuni poster sono disponibili nel sito <http://www.nlm.nih.gov/exhibition/visualculture/tuberculosis.html>.

Il contributo delle organizzazioni filantropiche fu fondamentale. In Francia, ad esempio, la prima rete di dispensari fu creata nel 1917 dalla Fondazione Rockefeller, e nel 1922 venne rilevata dallo Stato. Nel 1904, un impiegato postale danese, Einar Holboell (1865-1927), ideò francobolli, gravati da una piccola sovrattassa, dedicati alla lotta antitubercolare (fig. 1.17); questi ebbero un'enorme diffusione in tutto il mondo; altre iniziative private per raccogliere fondi furono create ovunque (13).



Fig. 1.16 - MANIFESTO PER LA CAMPAGNA ANTITUBERCOLARE.

I singoli Stati istituirono organismi nazionali per la lotta contro la tubercolosi, la Lega Nazionale in Francia (1891), l'Associazione Svizzera (1893), il Comitato Centrale Tedesco (1895), la Lega Italiana (1899). Gottfried von Pannwitz, fondatore nel 1895 del Comitato Centrale Germanico per l'Edilizia Sanatoriale, organizzò nel 1899 a Berlino un importantissimo congresso sulla tubercolosi, a cui per la prima volta erano presenti anche delegati dei governi e di organizzazioni non governative; si creò un primo coordinamento tra le varie attività antitubercolari. Nella Conferenza Internazionale del 1902, a Berlino, si adottò, su proposta di Gilbert Sersiron, la Croce di Lorena, insegna dei Crociati, come simbolo internazionale della lotta alla tubercolosi, assimilata in tale occasione a una crociata. Dopo la prima guerra mondiale, nel 1920 a Parigi, in un convegno a cui parteciparono 31 Paesi, tra cui delegati anche di Australia, America Latina e Iran, veniva decisa la fondazione della International Union Against Tuberculosis (IUAT, Union), concepita come federazione di Associazioni Nazionali. L'attività, interrotta a causa della seconda guerra mondiale, fu ripresa nel 1946. Nel 1958, venne condotto il primo trial clinico internazionale nella storia della terapia, per lo studio delle resistenze ai farmaci antitubercolari e, nel 1960, un secondo trial per valutare l'effetto della chemioterapia in soggetti mai trattati. Nel 1986, essendosi la sua attività estesa anche ad altre patologie polmonari, la IUAT fu trasformata in International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), nome attualmente in uso (12, 28).



Fig. 1.17 - FRANCOBOLLO A SOSTEGNO DELLA LOTTA ALLA TUBERCOLOSI.

1.30. LA PERCEZIONE DELLA MALATTIA

In epoca romantica la tisi era circondata da un'aura di eccezionalità, veniva avvertita come una misteriosa malattia individuale, sinonimo di distinzione, bellezza, amore, genio, sregolatezza, passione. Dalla seconda metà del XIX secolo questa percezione iniziò gradualmente ad affievolirsi.

La spaventosa incidenza e la mortalità tra gli strati più poveri della popolazione portò a una nuova visione della malattia, che divenne sinonimo di miseria e di privazione. Già nel 1912, il medico igienista Franz Koelsch (1876-1970), che diverrà il fondatore della Medicina del Lavoro in Baviera, aveva osservato come la diffusione tra le/i lavoratori fosse così imponente da giustificare il termine, da lui coniato, "malattia del proletariato". Con la consapevolezza della contagiosità della malattia, questa percezione venne ad affermarsi sempre più prepotentemente; gli sforzi della neonata Igiene pubblica, delle forze politiche e delle lotte operaie furono volti al miglioramento delle condizioni di vita attraverso il potenziamento dello stato sociale (47).

L'angoscia della malattia, privata di qualsivoglia atmosfera idilliaca, fu rappresentata più di ogni altro dal pittore norvegese Edvard Munch (1863-1944), che aveva vissuto fin da bambino la tragedia nella propria famiglia, con la morte della mamma e della sorellina, e ne era stato testimone nell'accompagnare il padre, medico, nelle visite alle famiglie, specialmente le più povere. La tubercolosi

divenne “il sangue della sua arte” che nacque dal desiderio di reazione e di rivolta, culminato nel dipinto *Il sole*, visto come fonte di vita e di speranza per ogni malata/o di tisi (fig. I.18). Nei suoi quadri emergono lo sgomento e l’abisso della morte, che non è più solo esperienza individuale, bensì espressione di un’epoca falciata dalla malattia (fig. I.19) (55).

La tubercolosi, che da malattia romantica era divenuta malattia della povertà, assunse, con l’avvento del nazismo, nel 1933, la connotazione di malattia “asociale”. Nella concezione nazional-socialista la salute rappresentava un dovere; dunque la malattia era considerata come “mancato adempimento al dovere” e avvertita in ultima analisi come un “fallimento personale e sociale”. Gli “untori della malattia”, uomini e donne, rappresentavano un attentato alla salute del Reich ed erano considerati privi di ogni valore (*wertlos*) per la comunità. Ritenuti portatori di materiale genetico scadente per la purezza della razza ariana, discriminati da apposite leggi, furono segregati a forza in strutture apposite, per lo più abbandonati a se stessi o uccisi sistematicamente, oppure inviati in prima linea al fronte. Non poche/i, tra i detenuti dei campi di concentramento che erano preda di epidemie paurose, furono inviati ai centri di sterminio. Nella Germania che era stata fino a pochi decenni prima un centro di eccellenza internazionale nella lotta alla tubercolosi, le persone furono utilizzate come cavie umane, sottoposte alla sperimentazione di nuove terapie e nuovi vaccini, da parte di medici delle SS e di medici militari o civili; tra questi il famigerato Josef Mengele (1911-1979) ad Auschwitz (45, 47, 54). L’efficacia del vaccino BCG venne testata a Vienna su bambini/e disabili o con ritardo mentale, sottoposti poi in modo sistematico ad autopsia (15). Il popolo ebraico venne accusato di diffondere la “tubercolosi razziale” in seno al Volk tedesco (74).

L’alone di paura, di vergogna, di miseria, di emarginazione che circondava la tubercolosi ha lasciato tracce fino ai nostri giorni.

Fig. I.19 - EDVARD MUNCH,
MARCIA FUNEBRE, 1897.



1.31. LA CHEMIOTERAPIA

Agli inizi del Novecento, sulla scia del successo di Paul Erlich, che aveva sintetizzato un composto arsenicale contro la sifilide, furono sperimentate numerose sostanze chimiche contro la tubercolosi: iodio, calcio, arsenico, rame, azo-coloranti, olio di fegato di merluzzo, morruato di sodio, cinnamati, terpeni, composti metallici. Vi fu persino l'impiego della aureoterapia, basata sulla somministrazione di un doppio tiosolfato di oro e di sodio; introdotta in terapia da Holger Mollgard (1885-1973), a Copenaghen nel 1925, venne poi abbandonata soltanto nel 1934, dopo che un trial completato negli Stati Uniti non solo ne dimostrò l'inefficacia, ma ne evidenziò anche l'effetto lesivo sui tessuti (1, 2, 3, 12, 38, 56).

La prima molecola in grado di penetrare la complessa struttura della parete micobatterica fu individuata nel 1941 da Horton Corwin Hinshaw (1902-2000) e dal suo collega veterinario William Hugh Feldman (1892-1974) in un sulfone, denominato "promina", che si rivelò in grado di inibire la progressione della tubercolosi in conigli e cavie infette. Ulteriori studi riguardanti la classe dei sulfoni portarono alla sintesi di un derivato, il promizolo, con minori effetti collaterali. Oltre ai derivati dello zolfo si testarono *in vitro* e in animali da esperimento innumerevoli composti della chimica organica, ormoni, vitamine (38, 56).

Il fenomeno dell'antibiosi (termine introdotto da Villemin) cioè l'antagonismo tra specie batteriche, già descritto da Bartolomeo Bizio (1791-1862) nel 1923, era stato osservato da vari studiosi, come Tyndall, Pasteur e Lister, ma fu il successo della sperimentazione della penicillina sull'essere umano, scoperta da Alexander Fleming (1881-1955) nel 1928, che diede un enorme impulso alla ricerca di sostanze farmacologicamente attive prodotte da vari tipi di microrganismi. Funghi, actinomiceti, batteri sporigeni e asporigeni e piante furono pazientemente indagati alla ricerca di molecole antitubercolari, finché si giunse all'individuazione della streptomicina (13, 38).

Finanziato dai laboratori Merck di Rahway (New Jersey), Selman Abraham Waksman (1888-1973), cinquantatreenne ucraino, dottore in agraria, appassionato studioso del suolo, condusse con il suo gruppo uno studio sistematico su decine di migliaia di microrganismi del terreno e del letame alla ricerca di "antibiotici", termine da lui coniato. La scoperta che *Streptomyces griseus* – specie peraltro già isolata dallo

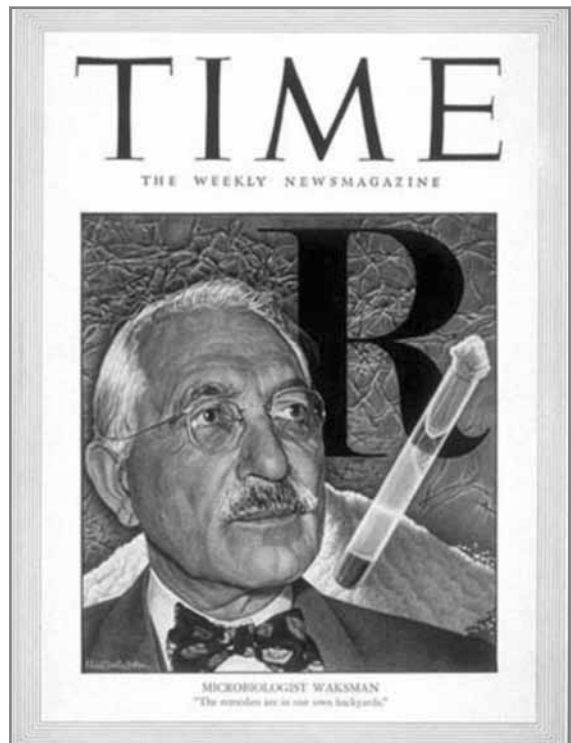


Fig. 1.20 - SELMAN ABRAHAM WAKSMAN. LA SCOPERTA DELLA STREPTOMICINA.

stesso Waksman ventisette anni prima in corso della preparazione della tesi di laurea – produceva una sostanza, la streptomina, in grado di inibire la crescita dei micobatteri, fu resa nota nel 1944 da Albert Schatz (1920-2005), Elizabeth Bugie e Selman Waksman con molta prudenza; era ancora vivo il ricordo di come la tubercolina avesse alimentato false speranze (fig. 1.20). Sempre nel 1944, dopo studi di efficacia su cavie condotti della Mayo Clinic, il farmaco fu iniettato per la prima volta con successo in una ventunenne, Patricia, figlia di contadini, prossima a soccombere per una forma di tubercolosi polmonare bilaterale diffusa. La donna, trattata con cinque cicli di streptomina, nell'arco di sei mesi guarì. Il passaggio dalla sperimentazione sugli animali a quella sull'uomo fu estremamente veloce (pochissimi mesi), giustificato dall'urgenza di disporre di un farmaco contro la tubercolosi, andata incontro a tremenda recrudescenza (5 milioni di decessi ogni anno) nei Paesi prostrati dalla seconda guerra mondiale, ancora in corso. Un intenso programma di sperimentazione clinica supervisionato dal National Research Council ne confermò le proprietà terapeutiche non solo nella tubercolosi polmonare, ma anche nelle forme extrapolmonari; la mortalità per meningite tubercolare scese nel 1947 dal 40% allo 0,6%. La streptomina, anche se gli scienziati tendevano a non sopravvalutarne l'importanza, fu presentata dai media come farmaco miracoloso; ne venne richiesta una quantità enorme, tanto che la compagnia Merck rinunciò all'esclusiva e ne permise la produzione da parte di altre case farmaceutiche. Studi successivi rivelarono che il suo uso, purtroppo, era gravato da importanti effetti collaterali, quali l'ototossicità con conseguente sordità. In occasione del conferimento del premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia, nel 1952, Selman Abraham Waksman, ebreo, citò l'*Ecclesiaste* (38:1-4): "L'Altissimo ha creato dalla terra le medicine e il saggio non le disdegherà". Il suo collaboratore neolaureato, Schatz, avviò una controversia legale, risoltasi favorevolmente per il riconosciuto contributo della scoperta del farmaco (5, 41, 56).

Un altro farmaco venne sintetizzato in Svezia grazie alla geniale intuizione di un medico danese, Joergen Lehmann (1898-1989). Nel 1940, egli venne a conoscenza di un esperimento, pubblicato su "Science", di un suo vecchio amico, Frederick Bernheim, dell'Università di Duke, che aveva notato come piccole quantità di acido acetilsalicilico fossero in grado di incrementare il consumo di ossigeno del bacillo tubercolare; ne dedusse che tale sostanza, a differenza di moltissime altre, era in grado di penetrare la complessa parete micobatterica e che una molecola simile, ma leggermente diversa, avrebbe potuto funzionare da inibitore competitivo interferendo nelle reazioni biochimiche del batterio. Notando la somiglianza chimica tra acido salicilico e sulfonamide, pensò di aggiungere all'acido acetilsalicilico un gruppo aminico in posizione para, nella stessa posizione cioè in cui tale gruppo era presente nella sulfonamide. Nel dicembre del 1943, tale struttura, denominata "pAS", acido para-aminosalicilico, sintetizzata da una casa farmaceutica svedese, si dimostrò in grado di inibire la crescita del bacillo tubercolare *in vitro* e nella cavia e, nell'ottobre del 1944, il pAS fu somministrato per la prima volta con successo a un paziente affetto da tubercolosi polmonare; altri report ne confermarono il valore (25).

Nonostante sia streptomina sia pAS, usati singolarmente, mostrassero un'efficacia iniziale, ben presto si osservarono le prime resistenze con la conseguenza che le/i pazienti andavano incontro a recidiva e morte. George Orwell (1903-1950), uno dei più importanti scrittori del Novecento, fu tra i primi a utilizzare la streptomina; dovette però sospenderla a causa di una grave allergia, e il trattamento successivo con pAS non riuscì a fermare la malattia. Nel 1948, il British Medical Rese-

arch Council iniziò dei trial volti a comparare l'efficacia del farmaco somministrato singolarmente o dei due farmaci in associazione. La loro somministrazione contemporanea si rivelò in grado di prevenire le resistenze e le recidive: era stata inventata la terapia di associazione, definita da Erlich, "una guerra affrontata con più armi", terapia che è ancora oggi il cardine del trattamento antitubercolare (25, 56).

Il concetto di "chemioterapico" fu introdotto da Erlich, antesignano delle colorazioni tessutali, che aveva per primo identificato coloranti in grado di legarsi selettivamente ai batteri; egli ipotizzò che coloranti con proprietà tossiche avrebbero potuto raggiungere e uccidere, in maniera mirata, i batteri senza essere di danno per l'organismo. Fu Gehrard Domagk (1895-1964), nel 1935, a svelare le proprietà antibatteriche di un colorante, il prontosil, il primo sulfamidico della storia, scoperta che gli valse nel 1939 il premio Nobel. Continuando nelle sue ricerche alla IG Farbenindustrie di Elberfeld (fabbrica di coloranti che sarebbe divenuta la casa farmaceutica Bayer) nel 1945, in una Germania distrutta dalle bombe alleate, Domagk sintetizzò un farmaco antitubercolare appartenente alla serie dei tiosemicarbazoni, nuova categoria chimica da lui stesso inventata. Denominato "Tb1" e prodotto con il nome commerciale "Conteben", fu utilizzato nel 1949 per curare circa settemila pazienti. Sperimentato negli Stati Uniti, tale farmaco si rivelò migliore della streptomycina nel trattare la tubercolosi laringea e intestinale. Gli Stati Uniti non riconobbero alcun diritto di brevetto alla Germania – il giornale "Time" uscì con un articolo dall'esauriente titolo "Bottino di guerra" – e ne iniziarono la produzione su larga scala. La struttura atomica dei tiosemicarbazoni divenne la base per gli studi dei ricercatori di case farmaceutiche, quali Hoffmann-La Roche, Squibb e Bayer, per la sintesi di nuove molecole antitubercolari (35).

È opinione diffusa che il premio Nobel del 1952 avrebbe dovuto essere assegnato, in associazione a Waksman, anche a Lehmann per la scoperta del pAS e a Domagk per quella di Tb1.

Nel frattempo veniva alla luce l'attività antitubercolare della nicotinamide (vitamina PP o B3 o niacina), scoperta da Vital Chorine nel 1944 e confermata nel 1945 da Ernst Huant e da altri ricercatori (58). Si pensò di così di creare un nuovo tiosemicarbazone derivato dalla nicotinamide, sostituendone l'anello benzenico con l'anello piridinico presente nella nicotinamide; nel 1951, tre case farmaceutiche, Bayer, Hoffman-La Roche e Squibb scoprirono, in modo indipendente, che un derivato intermedio della via dei tiosemicarbazoni, denominato "isoniazide", aveva proprietà antitubercolari di gran lunga superiori al prodotto finale. Non poterono tuttavia brevettarlo in quanto l'isoniazide era già stata sintetizzata, nel 1912, a Praga da Hans Meyer e Joseph Mally. Quarant'anni dopo la sua sintesi, l'isoniazide venne "riscoperta" come farmaco antitubercolare, potente, sicuro ed economico. Fra i suoi derivati, l'ipronazide, somministrata alle/ai pazienti dei sanatori, si rivelò efficace nell'elevare il tono dell'umore; fu così scoperto casualmente un farmaco antidepressivo, attualmente classificato nella categoria degli "inibitori della mono-amino ossidasi". Trial clinici dimostrarono antagonismo tra nicotinamide e isoniazide, per cui l'interesse nella nicotinamide venne meno (5).

Nello studio di analoghi della nicotinamide, S. Kushner e collaboratori scoprirono nel 1952 l'efficacia antitubercolare della pirazinamide, che era stata già sintetizzata in Germania nel 1936 da O. Dalmer ed E. Walter. Nonostante la sua attività clinica, essa occupò un ruolo marginale nella terapia, finché fu rivalutata nel 1972 dai trial di East Africa and British Medical Research Councils. Si sintetizzarono inoltre altri farmaci, la tiocarlide nel 1954, l'etionamide e la protionamide nel 1956

e la morfazinamide nel 1962. Nel 1961, nei laboratori di Lederle, in corso di test empirici *in vitro* fu scoperto l'etambutolo, che avendo minori effetti collaterali sostituì nella terapia il pAS. La kanamicina, isolata nel 1957, e il suo derivato semisintetico, l'amikacina, prodotto nel 1972, mostrarono maggiore attività antitubercolare rispetto alla streptomina (5, 13).

Negli anni '50, uno studioso della casa farmaceutica milanese Lepetit, in vacanza sulla Costa Azzurra, trovò casualmente un actinomicete rossastro, che fu denominato inizialmente *Streptomyces mediterranei*, poi *Nocardia mediterranei* e infine *Amycolatopsis rifamycinica*. Dopo accurate indagini, Pietro Sensi (1920-) e Maria Teresa Timbal (1925-1969) segnarono nel 1957 che alcuni metaboliti del microrganismo avevano spiccata attività antibatterica e antitubercolare. Tali metaboliti, a cui i due studiosi, appassionati di cinema, diedero il nome "rifamicine", dal titolo del film francese *Riffifi*, in auge a quel tempo, risultarono essere una miscela di cinque prodotti naturali. L'unico abbastanza stabile da poter essere isolato, la rifamicina B, di debole attività antimicobatterica, andava incontro a lenta degradazione spontanea e, passando attraverso un prodotto intermedio conosciuto come rifamicina O, portava alla rifamicina S, da cui, mediante riduzione, si giungeva alla rifamicina SV. Fu proprio la rifamicina SV la prima ad essere usata in terapia per via parenterale e per via topica; la sua potenza si rivelò impressionante, tanto che più di centocinquanta lavori, apparsi tra il 1961 e il 1965, ne attestarono l'efficacia su numerose infezioni batteriche, comprese tubercolosi e lebbra.

Viste le sue notevolissime potenzialità in ambito clinico, Piero Sensi iniziò una collaborazione con la casa farmaceutica svizzera Ciba-Geigy, al fine di ottenerne un farmaco disponibile per via orale. Furono prodotti centinaia di analoghi semisintetici delle rifamicine, finché lo sforzo fu coronato dal successo nel 1966, quando fu sintetizzata la rifampicina. Pur essendo attiva su numerosi batteri, si è pensato, purtroppo con scarso successo, di confinare il suo uso alla terapia della tubercolosi per limitare il rischio di sviluppo delle resistenze (25).

Nessun altro farmaco riuscì a trasformare così radicalmente la chemioterapia della tubercolosi. Prima della sua scoperta, il trattamento durava dai dodici ai diciotto mesi; con la sua introduzione si inaugurò il moderno trattamento breve (*short course*) di sei mesi; venne definitivamente accertato che il trattamento della tubercolosi, dall'inizio alla fine, avrebbe potuto essere condotto a domicilio, senza ospedalizzazione, come dimostrato da Fox nel 1959 nello studio realizzato al Tuberculosis Chemotherapy Centre di Madras (India) (5, 12). La maggior parte dei sanatori, già in declino, vennero chiusi; la tubercolosi era divenuta, dopo millenni, una malattia curabile.

Si ebbe di nuovo l'impressione che la tubercolosi fosse sul punto di essere debellata, come aveva affermato, fiero, Waksman, lo scopritore della streptomina: "*The disease has been conquered*", la malattia è vinta (13). La realtà attuale dimostra che non si trattava nient'altro che di una delle tante illusioni di cui è disseminata la storia della lotta alla tubercolosi. Ma questa è storia recente.

BIBLIOGRAFIA

1. Anonimo, *Chemotherapy in tuberculosis*, 1944, *Can Med Assoc J*; 50:365.
2. Anonimo, *Chemotherapy of tuberculosis*, 1945, *Br Med J* 19; 1:704.
3. Anonimo, *The chemotherapy of tuberculosis*, 1946, *Br Med J*; 7,2:862-863.
4. Barnes D.S., *Historical perspectives on the etiology of tuberculosis*, 2000, *Microbes Infect*; 2:431-440.
5. Barry C.E., *Lessons from seven decades of antituberculosis drug discovery*, 2011, *Curr Top Med Chem*; 11:1216-1225.
6. Bell M.E., *Food for the dead: on the trail of New England's vampire*, 2011, Wesleyan University.
7. Bloch M., *I re taumaturghi*, 2005, Einaudi.
8. Brock T.D., *Robert Koch: a life in medicine and bacteriology*, 1988, ASM Press.
9. Campbell M., *What tuberculosis did for modernism: the influence of a curative environment on modernist design and architecture*, 2005, *Medical History*; 49:463-488.
10. Canci A., Minozzi S., Borgognini Tarlu S.M., *New evidence of tuberculous spondylitis from Neolithic Liguria (Italy)*, 1996, *Int J Osteoarchaeol*; 6:497-501.
11. Caprara G., *L'avventura della scienza. Sfide, invenzioni e scoperte nelle pagine del "Corriere della sera"*, 2009, Rizzoli.
12. Cardoso Leão S., Portaels F., *History*, in: *Tuberculosis 2007*. Ed. Palomino J.C., Cardoso Leão S., Ritacco V.
13. Chretien J., *Tuberculosis. The illustrated history of a disease*, 1998, Hauts de France, Bethune.
14. Cosmacini G., *Storia della medicina e della sanità in Italia. Dalla peste nera ai nostri giorni*, 2005, Laterza.
15. Dahl M., "... sustaining their lives has no advantage to the nation." *Handicapped children as research subjects and the development of preventive tuberculosis vaccination*, 2002, *Medizinhist J*; 37:57-90.
16. Daniel T.M., *Clemens Freiherr von Pirquet and the tuberculin test*, 2003, *Int J Tuberc Lung Dis*; 7:1115-1116.
17. Daniel T.M., *The history of tuberculosis*, 2006, *Respir Med*; 100:1862-1870.
18. Daniel V.S., Daniel T.M., *Old Testament biblical references to tuberculosis*, 1999, *Clin Infect Dis*; 29:1557-1558.
19. de la Rúa-Domenech R., *Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis*, 2006, *Tuberculosis*; 86:77-109.
20. Doetsch R.N., *Benjamin Marten and his "New Theory of Consumptions"*, 1978, *Microbiol Rev*; 42: 521-528.
21. Donoghue H.D., Spigelman M., Greenblatt C.L., Lev-Maor G., Bar-Gal G.K., Matheson C., Vernon K., Nerlich A.G., Zink A.R., *Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA*, 2004, *Lancet Infect Dis*; 4:584-592.
22. Donoghue H.D., *Human tuberculosis-an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules*, 2009, *Microbes Infect*; 11:1156-1162.
23. Donoghue H.D., *Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis*, 2011, *Clin Microbiol Infect*; 17:821-829.

24. Donoghue H.D., *Palaemicrobiology of tuberculosis*, in: Raoult D., Drancourt M., *Paleomicrobiology: past human infections*, 2008, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
25. Dougherty T.J., Pucci M.J., *Antibiotic discovery and development*, 2012, Springer.
26. Dubos R.J., Dubos J., *The white plague: tuberculosis, man and society*, 1952, Little Brown, Boston.
27. Dumas A. (figlio), *La signora dalle camelie*, 2006, Biblioteca Universale Rizzoli, Milano.
28. Enarson D.A., Rouillon A., *Zur Geschichte der Internationalen Union gegen Tuberkulose und Lungenkrankheiten (Storia della IUATLD, International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases)*, 2009, *Pneumologie*; 63:582-584.
29. Evans C.C., *Historical background*, in: Davies P.D.O. Ed., *Clinical tuberculosis*, 1998, Chapman & Hall, London.
30. Fayssoil A., *René Laennec (1781-1826) and the invention of the stethoscope*, 2009, *Am J Cardiol*; 104:743-744.
31. Finer K.R., Alcamo I.E., *Tuberculosis*, 2003, Infobase Publishing.
32. Flaws B., *The secret of Chinese pulse diagnosis*, 1995, Blue Poppy Enterprises, Inc.
33. Grange J.M., *Mycobacterium bovis infection in human beings*, 2001, *Tuberculosis*; 81:71-7.
34. Groos A., 'TB Sheets': Love and disease in "La traviata", 1995, *Cambridge Opera Journal*, 1995; vol. 7, 3:233-260.
35. Grundmann E., *Gerhardt Domagk: The first man to triumph over infectious diseases*, 2004, LIT Verlag Münster.
36. Guglielminetti E., *Il mondo in eccesso: scambio dei toni in Hölderlin e Novalis*, 2003, Editoriale Jaca Book.
37. Gutierrez M.C., Brisse S., Brosch R., Fabre M., Omais B., Marmiesse M., Supply P., Vincent V., *Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis*, 2005, *PLoS Pathog*; 1:e5.
38. Hart P.D., *Chemotherapy of tuberculosis - Part II*, 1946, *Br Med J*; 7, 2:849-55.
39. Hershkovitz I., Donoghue H.D., Minnikin D.E., Besra G.S., Lee O.Y., Gernaey A.M., Galili E., Eshed V., Greenblatt C.L., Lemma E., Bar-Gal G.K., Spigelman M., *Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean*, 2008, *PLoS One*; 3:e3426.
40. Herzog H., *History of tuberculosis*, 1998, *Respiration*; 65:5-15.
41. Heynick F., *Jews and Medicine: an epic saga*, 2002, KTAV Publishing House, Inc.
42. Hobday R.A., *Sunlight therapy and solar architecture*, 1997, *Medical History*; 42:455-472.
43. Kappelman J., Alçiçek M.C., Kazanci N., Schultz M., Ozkul M., Sen S., *First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia*, 2008, *Am J Phys Anthropol*; 135:110-116.
44. Kawamura E., *Il soggiorno dei tiscici inglesi negli alberghi italiani e svizzeri tra Ottocento e Novecento*, in: *Storia del turismo*, Annale 2005, vol. 6, a cura di Berrino A., 2007, Milano.
45. Keltling K., *Das Tuberkulose problem im Nationalsozialismus (Il problema della tubercolosi nel nazionalsocialismo)*, 1974, Diss Med, Kiel.
46. Kligfield P., *Laennec and the discovery of mediate auscultation*, 1981, *Am J Med*; 70:275-278.
47. Ley A., *Zwischen Erleiden und Infektionskrankheit: Wahrnehmung und Umgang mit Tuberkulose im Nationalsozialismus (Tra malattia ereditaria ed infettiva, la percezione ed il trattamento della tubercolosi nel nazionalsocialismo)*, 2006, *Pneumologie*; 60:360-365.

48. Madkour M.M., *Tuberculosis*, 2004, Springer, Berlin.
49. Malato M.T., *Storia della Medicina*, 1994, Delfino, Roma.
50. Monaldi V., *La tubercolosi*, 1965, Il pensiero scientifico, Roma.
51. Montizambert F., *The British Congress on Tuberculosis, July 22-27, 1901*, Public Health Pap Rep 1901; 27:35-44.
52. Morelli E., Daddi G., *Trattato di fisiologia*, 1961, Vallardi.
53. Morens D.M., *At the deathbed of consumptive art*, 2002, Emerg Infect Dis; 8:1353-1358.
54. Müller-Hill B., *Genetics of susceptibility to tuberculosis: Mengele's experiments in Auschwitz*, 2001, Nat Rev Genet; 2:631-634.
55. Munch E., *Frammenti sull'arte / Edvard Munch; a cura di Marco Alessandrini*, 2007, Adscandita, Milano.
56. Murray J.F., *A century of tuberculosis*, 2004, Am J Respir Crit Care Med; 169:1181-1186.
57. Murray J.F., *The white plague: down and out, or up and coming? J. Burns Amberson lecture*, 1989, Am Rev Respir Dis; 140:1788-1795.
58. Murray M.F., *Nicotinamide: an oral antimicrobial agent with activity against both Mycobacterium tuberculosis and human immunodeficiency virus*, 2003, Clin Infect Dis; 36:453-460.
59. Parola L., *Della tubercolosi in genere e della tisi polmonare in specie*, 1849, Torino.
60. Perletti G., *Dal mal sottile al mal gentile. Estetica del Brutto*, a cura di Remo Bodei, Bologna, Il Mulino, 1984.
61. Petrov B.D., *La lotta alla tubercolosi nell'Unione Sovietica secondo l'idea di V.I. Lenin* (articolo in russo), 1980, Probl Tuberk; 4:3-6.
62. Piave F.M., *La Traviata / libretto di Francesco Maria Piave F.M.; Verdi G*, 1857, Ricordi.
63. Plotkin S.A., *History of Vaccine Development*, 2011, Springer.
64. Roberts C.A., Pfister L.A., Mays S., *Letter to the editor: was tuberculosis present in Homo erectus in Turkey?*, 2009, Am J Phys Anthropol; 139:442-444.
65. Rossattini S., *Un villaggio straordinario: villaggio Morelli, il più grande sanatorio d'Europa: idea e ideali fra medicina, storia e natura*, 2002, Litostampa, Istituto Grafico.
66. Sabbatani S., *L'intuizione di Girolamo Fracastoro sul contagio della tisi ed i suoi oppositori. Storia di un'idea*, 2004, Le Infezioni in Medicina; 14:284-291.
67. Sabbatani S., *La nascita dei sanatori e lo sviluppo socio-sanitario in Europa ed in Italia. La lotta alla tubercolosi dal periodo post-risorgimentale al 1930*, 2005, Le Infezioni in Medicina; 13:123-132.
68. Sabbatani S., Fiorino S., *Apporti della paleopatologia alla definizione della patogenesi delle malattie infettive (Prima parte)*, 2008, Le Infezioni in Medicina; 16:236-250.
69. Sabbatani S., Fiorino S., *Apporti della paleopatologia alla definizione della patogenesi delle malattie infettive (Seconda parte)*, 2009, Le Infezioni in Medicina; 17:47-63.
70. Sakula A., *Carlo Forlanini, inventor of artificial pneumothorax for treatment of pulmonary tuberculosis*, 1983, Thorax; 38:326-332.
71. Sala E., *Il Valzer delle Camelie: echi di Parigi nella Traviata*, 2008, EDT.
72. Saltini C., *Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis*, 2006, Respir Med; 100:2085-2097.

73. Sledzik P.S., Bellantoni N., *Brief communication: bioarcheological and biocultural evidence for the New England vampire folk belief*, *Am J Phys Anthropol* 1994; 94:269-274.
74. Sontag S., *Malattia come metafora. AIDS e cancro*, 1992, Einaudi.
75. Taylor G.M., Murphy E., Hopkins R., Rutland P., Chistov Y., *First report of Mycobacterium bovis DNA in human remains from the Iron Age*, 2007, *Microbiology*; 153:1243-1249.
76. Teschner M., *Tuberculose im althistorischen Hellas (La tubercolosi nell'antica Grecia)*, 2006, *Pneumologie*; 60:401-407.
77. Tracht D., *Architektur von Volksheilstaetten um 1900 (Architettura dei sanatori intorno al 1900)*, 2005, *Pneumologie*; 59:901-909.
78. Wai-Ming Ng., *The I Ching in Tokugawa thought and culture*, 2000, University of Hawaii Press.
79. Waksman S.W., *The conquest of tuberculosis*, 1964, University of California Press, Berkeley.
80. Wirth T., Hildebrand F., Allix-Béguec C., Wöbeling F., Kubica T., Kremer K., van Soolingen D., Rüscher-Gerdes S., Locht C., Brisse S., Meyer A., Supply P., Niemann S., *Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex*, 2008, *PLoS Pathog*; 19:e1000160.
81. Zink A.R., Sola C., Reischl U., Grabner W., Rastogi N., Wolf H., Nerlich A.G., *Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:359-367.
82. Ziskind B., Halioua B., *La tuberculose en ancienne Égypte*, 2007, *Rev Mal Respir*; 24:1277-1283.

Capitolo 2

GENERALITÀ SUI MICOBATTERI

Enrico Tortoli

1. IL GENERE *MYCOBACTERIUM*

Il genere *Mycobacterium*, uno dei *taxa* batterici più vecchi e meglio conosciuti, fu introdotto nel 1896 da Lehmann e Neumann; il suo nome prende origine dalla convinzione, rivelatasi poi errata, che costituisse un *trait d'union* fra miceti e batteri. Al momento della sua creazione furono collocate al suo interno due specie già note, *Bacillus leprae* (Hansen, 1880) e *Bacillus tuberculosis* (Zopf, 1883), il cui appellativo “*Bacillus*” venne cambiato, in tale occasione, in “*Mycobacterium*”.

La prima specie ufficialmente riconosciuta, *Mycobacterium leprae*, è l'agente eziologico della lebbra, malattia antichissima che colpisce la cute e i nervi periferici. *Mycobacterium leprae*, a differenza delle altre specie appartenenti al genere *Mycobacterium*, non è coltivabile su terreni artificiali.

Nell'ambito dei micobatteri coltivabili *in vitro*, il *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) si differenzia nettamente per habitat, patogenicità, contagiosità e sensibilità ai chemioterapici da tutte le altre specie. Queste ultime sono state nel tempo indicate collettivamente con varie denominazioni: “micobatteri atipici”, “micobatteri non tubercolari” o MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*), “micobatteri ambientali potenzialmente patogeni” o PPEM (*Potentially Pathogenic Environmental Mycobacteria*), “micobatteri non tubercolari” o NTM (*Non Tuberculous Mycobacteria*). Quest'ultima è certamente la denominazione più appropriata, mentre quella di “micobatteri atipici” è ormai considerata non corretta.

In base alle conoscenze attuali, il genere *Mycobacterium* risulta definito da una serie di caratteristiche peculiari sia a livello fenotipico che genotipico. Comprende batteri aerobi asporigeni e non capsulati, non mobili, di dimensioni variabili (0,2-0,6 x 1-10 μm), con morfologia bacillare, anche se raramente si possono presentare ramificazioni destinate a frammentarsi. Per quanto riguarda la colorazione, i micobatteri sono Gram-positivi, anche se la capacità di legare il colorante basico è ridottissima. Sono invece in grado di legare stabilmente coloranti fenicati che vengono trattenuti nella parete anche dopo trattamento con decoloranti molto energici quali alcol e acidi forti. Tale proprietà è conosciuta come alcol-acido-resistenza.

I micobatteri sono, all'interno del regno dei *Bacteria*, i microrganismi con il più elevato contenuto lipidico; i lipidi sono localizzati a livello della parete cellulare e consistono in acidi micolici, acidi grassi saturi e insaturi e cere. Il fenomeno della alcol-acido-resistenza è legato proprio alla presenza di lipidi nella parete.

Gli acidi micolici costituiscono la componente lipidica più interessante. Si tratta di acidi grassi ad alto peso molecolare composti da una corta catena idrossilata in posizione β e ramificati in posizione α per la presenza di una lunga catena alchilica; essi, pur non essendo esclusivi dei micobatteri (sono anche presenti nelle specie appartenenti ai generi *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Tsukamurella*), raggiungono, a livello del genere *Mycobacterium*, la lunghezza massima con un numero di atomi di carbonio compreso fra 60 e 90. Gli acidi micolici dei micobatteri possono presentare, in varia posizione, dei gruppi ossigenati in base ai quali è possibile distinguerne sette differenti tipi.

Il genere *Mycobacterium* condivide con alcuni generi geneticamente correlati (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*) un genoma particolarmente ricco in guanina e citosina (62-70 mol % G+C).

I micobatteri hanno tempi di replicazione assai più lunghi di quelli degli altri batteri. *Mycobacterium leprae* impiega per replicarsi circa un mese, *Mycobacterium tuberculosis* circa 20 ore; si tratta di tempi lunghissimi se si pensa che *Escherichia coli* si moltiplica ogni 20 minuti. All'interno del genere *Mycobacterium* si definiscono a crescita rapida le specie che, a partire da un inoculo standardizzato, formano, su terreno solido, colonie visibili entro sette giorni. Tempi più lunghi, talvolta superiori a un mese, sono richiesti dalle specie a crescita lenta.

2. CENNI DI FILOGENESI E TASSONOMIA DEI MICOBATTERI

La recente sistematica colloca il genere *Mycobacterium* all'interno della famiglia delle *Mycobacteriaceae* facente parte della classe delle *Actinobacteridae* (tab. 1).

Tab. 1 - INQUADRAMENTO TASSONOMICO DEL GENERE *MYCOBACTERIUM*.

Regno	<i>Bacteria</i>
Tipo	<i>Actinobacteria</i>
Classe	<i>Actinobacteridae</i>
Ordine	<i>Actinomycetales</i>
Sotto-ordine	<i>Corynebacterineae</i>
Famiglia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Genere	<i>Mycobacterium</i>

La tassonomia, non solo dei micobatteri, ha subito, negli ultimi anni, notevoli cambiamenti legati principalmente al vertiginoso sviluppo delle conoscenze in ambito genomico che ha portato al passaggio da un metodo di classificazione basato sul fenotipo a quello genotipico. La classificazione dei micobatteri fondata sul fenotipo si basava sull'analisi di caratteri colturali (velocità di crescita, pigmentazione delle colonie, temperatura di crescita) e di caratteri biochimici (soprattutto attività metaboliche). Tale approccio, inizialmente condotto in maniera empirica, aveva assunto negli anni '70 una più rigorosa base scientifica con l'introduzione della tassonomia numerica (5).

La tassonomia basata sul genotipo si è sviluppata in seguito all'individuazione, all'interno del genoma, di regioni conservate. Si definiscono "conservate" quelle regioni che, regolando funzioni essenziali, hanno subito meno variazioni durante l'evoluzione; esse costituiscono il target ideale per gli studi tendenti a evidenziare affinità o diversità tassonomicamente utili. A differenza di quanto avviene nelle regioni variabili, in cui le diversità sono talmente estese da risultare ininterpretabili a fini classificativi, nelle regioni conservate le mutazioni a livello di singole basi risultano altamente informative.

La conseguenza più evidente del passaggio dall'approccio fenotipico a quello genotipico è l'aumento esplosivo del numero di specie facenti parte del genere *Mycobacterium*. Ad oggi quelle uffi-

cialmente riconosciute sono quasi 150, oltre il doppio di quelle note appena 20 anni fa. Se è vero che la maggior parte delle specie “classiche”, definite in base ai caratteri fenotipici, sono state confermate dagli studi genetici, è anche vero che in molti casi si è assistito al frazionamento di alcune di esse in due o più entità tassonomiche.

Fra le regioni conservate, quella per cui è disponibile la più vasta mole di informazioni include il gene che codifica per l'rRNA 16S (4). Dall'analisi della sua sequenza genica i micobatteri risultano chiaramente ripartiti in due raggruppamenti maggiori, differenziati per la presenza, in uno di essi, di un'inserzione di lunghezza variabile all'interno del tratto noto come elica 18 (fig. 2.1). È interessante notare che tutte le specie di micobatteri a crescita rapida mancano dell'inserzione all'interno dell'elica 18, mentre nelle specie a crescita lenta, salvo rare eccezioni, essa è presente. Sembra oggi verosimile che i micobatteri ancestrali fossero caratterizzati da elica 18 corta (senza inserzione) e, a livello fenotipico, da crescita rapida. Il processo evolutivo avrebbe inizialmente portato alla differenziazione di un nuovo fenotipo a crescita lenta, accompagnato, in quasi tutte le specie, da un'inserzione di 12 pb a livello dell'elica 18. Solo un piccolo gruppo di specie a crescita lenta avrebbe invece conservato la struttura priva di inserzione; tale gruppo, di cui attualmente si conoscono 17 specie, è comunemente indicato come *Mycobacterium simiae* complex dato che *Mycobacterium simiae* è stata la prima specie in cui tale caratteristica è stata riconosciuta. All'interno del raggruppamento che include la stragrande maggioranza dei micobatteri a crescita lenta, contraddistinti dall'inserzione di 12 pb, un successivo filone evolutivo, costituito da undici specie raggruppate nel *Mycobacterium terrae* complex, è successivamente andato incontro a un'ulteriore inserzione di 2 pb, sempre all'interno dell'elica 18. Nell'ambito delle specie a crescita rapida, tutte caratterizzate dalla mancanza di inserzioni nell'elica 18, un gruppo abbastanza consistente di micobatteri, definiti “termo-tolleranti”, si è differenziato dagli altri per l'inserzione di una singola base (citosina) nell'elica 10.

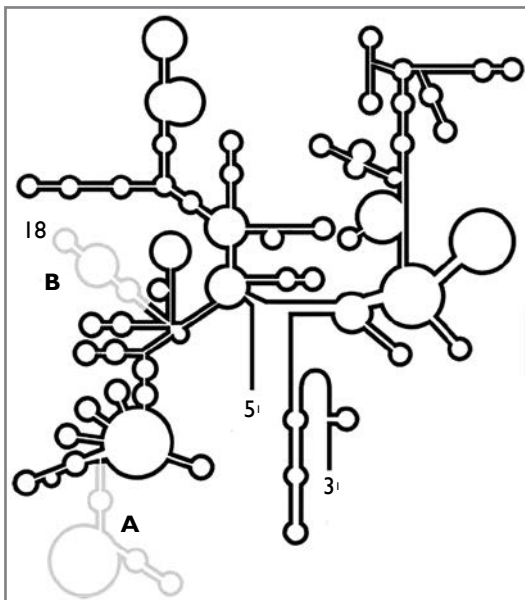
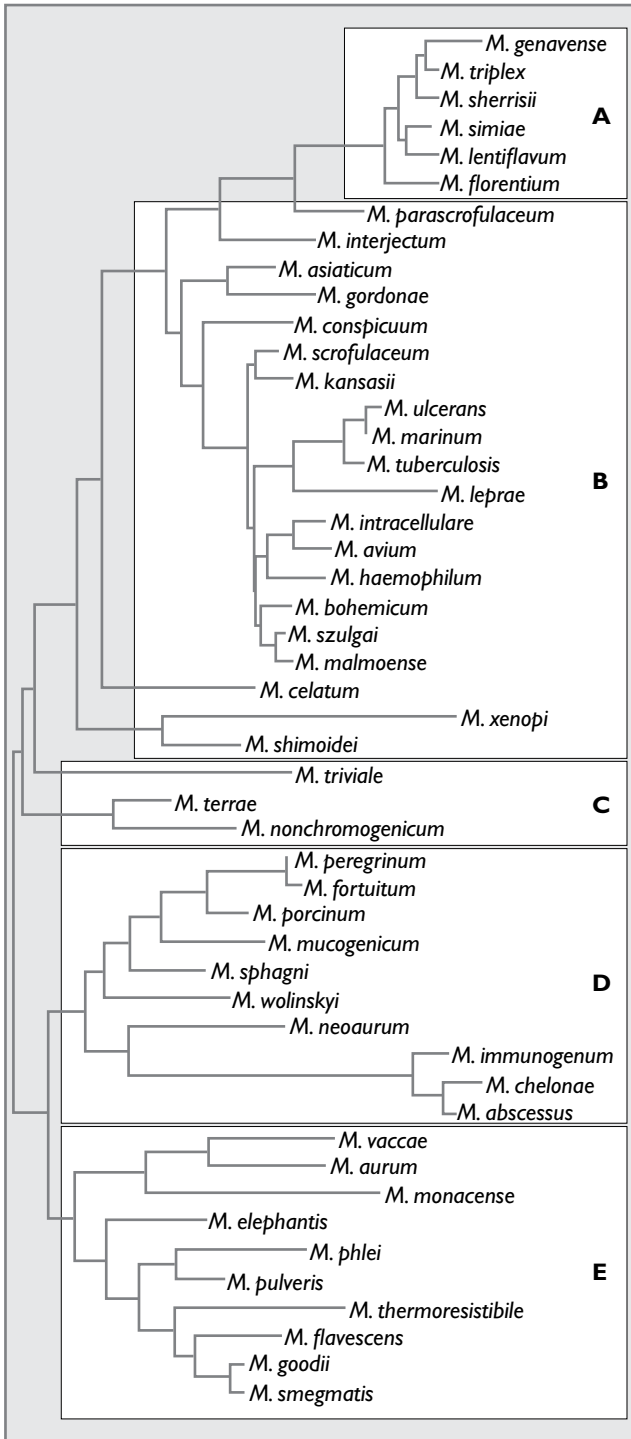


Fig. 2.1 - STRUTTURA SECONDARIA DELL'rRNA 16S.

A: REGIONE IPERVARIABILE A;

B: REGIONE IPERVARIABILE B;

18: ELICA 18.



Nell'ambito dei micobatteri a crescita rapida il livello di correlazione genetica è elevatissimo, tanto che, risultando il potere discriminante dell'rDNA 16S spesso inadeguato, i tassonomisti tendono a spostare l'interesse su regioni meno conservate quali l'*Internal Transcribed Spacer* (ITS) e soprattutto il gene *rpoB* (1).

L'analisi del genotipo permette anche di ricostruire il percorso evolutivo che ha portato alla differenziazione delle specie a partire da un progenitore comune (filogenesi) (2). Occorre prendere atto del fatto che l'analisi filogenetica è condizionata in modo consistente dalla regione genomica su cui essa si basa, tanto che lo studio di regioni diverse porta a ricostruzioni evolutive, esprimibili graficamente in forma di dendrogrammi, non sempre sovrapponibili (il dendrogramma illustrato in figura 2.2 è basato sul gene che codifica per l'rRNA 16S). Negli ultimi anni ha preso piede l'idea che risultati più affidabili possano ottenersi soltanto ricorrendo allo studio combinato delle principali regioni conservate (1); è tuttavia indubbio che il sequenziamento

Fig. 2.2 - DENDROGRAMMA RELATIVO ALLE SPECIE PIÙ CONOSCIUTE DEL GENERE MYCOBACTERIUM:
A) M. SIMIAE COMPLEX;
B) MICOBATTERI A CRESCITA LENTA;
C) M. TERRAE COMPLEX;
D) MICOBATTERI A CRESCITA RAPIDA;
E) MICOBATTERI TERMO-TOLLERANTI.

dell'intero genoma, divenuto oggi possibile in tempi brevi grazie all'introduzione del *next generation sequencing* e allo sviluppo della bioinformatica, aprirà presto nuovi orizzonti agli studi filogenetici.

L'uso sempre più diffuso del sequenziamento genico evidenzia con frequenza crescente la presenza di sequenze “nuove” non presenti in alcun database o comunque, quando presenti, non attribuite ad alcuna specie. Di fronte a tali reperti è doveroso chiedersi se esse individuino nuove specie o siano varianti di specie conosciute. È oltremodo difficile dare una risposta certa a tale domanda, tanto più che i membri del genere *Mycobacterium* sono correlati fra loro in maniera molto più stretta rispetto agli altri microrganismi. Né, d'altra parte, è mai stato stabilito un *cut-off*, cioè un numero minimo di basi discrepanti, che possa essere utilizzato per decidere se due micobatteri appartengano alla stessa specie o a specie diverse. L'unico aiuto, attualmente, sembra venire dalla rivalutazione dell'analisi dei caratteri fenotipici, almeno dei più significativi. Rientrano certamente in tale novero la velocità di crescita e la pigmentazione delle colonie, ma anche i pattern lipidici della parete cellulare. Sembra infatti ragionevole supporre che due micobatteri con sequenze affini, ma non identiche, rappresentino varianti della stessa specie se, condividendo velocità di crescita (rapida o lenta) e tipo di pigmentazione delle colonie, hanno anche profili lipidici compatibili, e che appartengano invece a specie diverse se differiscono per almeno uno dei caratteri sopracitati.

Il numero di specie caratterizzate dall'esistenza al loro interno di varianti di sequenza, o *sequevar*, è molto aumentato negli ultimi anni, e attualmente sono pochissime quelle che non ne hanno affatto. Fra quelle con il numero di *sequevar* più elevato si segnalano *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*.

La sistematica non prevede entità intermedie fra genere e specie; nel genere *Mycobacterium* sono tuttavia largamente usati raggruppamenti a tale livello quali i complessi (complex). Essi includono specie non facilmente differenziabili, nonché simili per il loro significato clinico. I più conosciuti sono il *Mycobacterium tuberculosis* complex e il *Mycobacterium avium* complex (tab. 2). Nota a tutti è la classificazione di Runyon (3) che ha ormai soltanto valore storico. Essa ripartisce le specie del genere *Mycobacterium* in quattro gruppi basati sulla velocità di crescita e sulla pigmentazione delle colonie.

In ambiente clinico la tassonomia è spesso considerata una disciplina di secondo livello, lontana dalla pratica medica. Una tale concezione non ha fondamenti oggettivi: le varie specie micobatteriche differiscono per virulenza e, in molti casi, per la sensibilità ai farmaci; basti pensare che i micobatteri a crescita lenta si differenziano in maniera nettissima da quelli a crescita rapida per quanto riguarda l'antibiotico-sensibilità e che nel *Mycobacterium simiae* complex si concentrano molte specie resistenti a praticamente tutti i farmaci. Il corretto inquadramento tassonomico fornisce quindi informazioni utili per quanto riguarda la patogenicità del ceppo isolato, la decisione di intraprendere o meno una terapia e la scelta appropriata dei farmaci.

Tab. 2 - I PRINCIPALI COMPLESSI DEL GENERE *MYCOBACTERIUM*.*

Complessi	Specie
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. bovis</i> BCG <i>M. microti</i> <i>M. africanum</i> <i>M. caprae</i> <i>M. pinnipedii</i> "M. canettii"
<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. chimaera</i> <i>M. colombiense</i> <i>M. arosiense</i> <i>M. vulneris</i> <i>M. bouchedorhonense</i> <i>M. marseillense</i> <i>M. timonense</i> <i>M. yongonense</i>
<i>Mycobacterium terrae</i> complex	<i>M. terrae</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. arupense</i> <i>M. kumamotoense</i> <i>M. senuense</i> <i>M. algericum</i> <i>M. engbaekii</i> <i>M. heraklionense</i> <i>M. longobardum</i> <i>M. minnesotense</i>
<i>Mycobacterium simiae</i> complex	<i>M. simiae</i> <i>M. genavense</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. triplex</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. heidelbergense</i> <i>M. kubicae</i> <i>M. palustre</i> <i>M. montefiorensis</i> <i>M. parmense</i> <i>M. saskatchewanense</i> <i>M. parascrofulaceum</i> <i>M. florentinum</i> <i>M. stomatepiae</i> <i>M. sherrisii</i> <i>M. europaeum</i> "M. tilburgii"

*Fra virgolette le specie non ufficialmente riconosciute.

BIBLIOGRAFIA

1. Adékambi T., Colson P., Drancourt M., *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:5699-5708.
2. Rogall T., Wolters J., Flohr T., Böttger E.C., *Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium*, 1990, *Int J Syst Bacteriol*; 40:323-330.
3. Runyon E.H., *Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics*, 1970, *Am J Clin Pathol*; 54:578-586.
4. Tortoli E., *Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s*, 2003, *Clin Microbiol Rev*; 16:319-354.
5. Wayne L.G., Good R.C., Krichevsky M.I., Blacklock Z., David H.L., Dawson D., Gross W., Hawkins J., Jenkins P.A., Juhlin I., Kämpfer W., Kleeberg H.H., Krasnow I., Lefford M.J., Mankiewicz E., McDermont C., Nel E.E., Portaels F., Richards P.A., Rüsche S., Schröder K.H., Silcox V.A., Szabó I., Tsukamura M., van den Breen L., Yakus M.A., *Third report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy*, 1989, *Int J Syst Bacteriol*; 39:267-278.

Capitolo 3

LA TUBERCOLOSI

**Claudio Scarparo,
Luigi Ruffo Codecasa,
Eliana Frizzera**

3. LA TUBERCOLOSI

La tubercolosi è causata da micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex, che comprende le specie *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti* e “*Mycobacterium canettii*”. Tali specie sono patogene, fatta eccezione per *Mycobacterium bovis* BCG e *Mycobacterium microti*, che causano malattia solo occasionalmente.

3.1. ASPETTI EPIDEMIOLOGICI

3.1.1. LA TUBERCOLOSI NEL MONDO

La tubercolosi rappresenta ancora oggi un'emergenza mondiale e un enorme problema di salute pubblica, nonostante il numero di persone che si ammalano sia in costante declino e il tasso di mortalità sia sceso del 40% dal 1990.

Secondo il rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2011 (37), l'incidenza di tubercolosi nel 2010 riguarda globalmente circa 8,8 milioni di persone, equivalenti a 128 casi ogni 100.000 abitanti. Di queste, 2,65 milioni, risultando positive all'esame microscopico dell'escreato, hanno contribuito alla diffusione della malattia. La distribuzione di questi nuovi casi ha interessato soprattutto i Paesi poveri del mondo: ai primi posti figurano la Regione asiatica (59%) e quella africana (26%). Sempre nel 2011, sono morte per tubercolosi circa 1,1 milioni di persone fra gli HIV-negativi e circa 300.000 fra gli HIV-positivi. La proporzione di casi di tubercolosi in soggetti con HIV è particolarmente elevata nei Paesi africani, dove complessivamente raggiunge l'82% del carico complessivo a livello mondiale. Si stima che nel 2009 siano rimasti orfani circa 9,7 milioni di bambini a causa della morte per tubercolosi dei genitori. Per quanto concerne la prevalenza, nel 2010 sono stati stimati globalmente circa 12 milioni di casi di tubercolosi, pari a 178 casi per 100.000 abitanti. Circa due miliardi di persone, un terzo della popolazione mondiale, risultano infettate dal micobatterio tubercolare. Di queste, mediamente, una persona su dieci si ammalerà di tubercolosi nel corso della vita; da notare che fra gli HIV-positivi il rischio relativo è molto più elevato.

La strategia promossa dall'OMS per contenere il fenomeno tubercolosi, denominata DOTS (*Directly Observed Therapy Short-course*), si basa su cinque capisaldi:

- impegno politico e finanziario;
- diagnosi basata sul riscontro microbiologico del bacillo tubercolare;
- terapia standardizzata con assunzione dei farmaci supervisionata da operatori sanitari o da volontari (DOT, *Directly Observed Therapy*);
- garanzia di fornitura ininterrotta di farmaci ai centri di cura;
- valutazione del risultato del trattamento.

Altri obiettivi sono stati aggiunti nel 2006, quali il rafforzamento dei sistemi sanitari, il coordinamento tra le strutture per la lotta alla tubercolosi e all'HIV e il coinvolgimento degli operatori e dei pazienti nella politica sanitaria di controllo.

L'applicazione di questa strategia ha portato, dopo anni di costante aumento, alla stabilizzazione, e in alcuni Paesi, anche alla riduzione dell'epidemia tubercolare.

Purtroppo, la presenza di forme resistenti ai farmaci, dovuta spesso a mancanza di aderenza da parte del paziente ai protocolli terapeutici standardizzati e alle carenze dei sistemi sanitari, costituisce un serio ostacolo al programma DOTS, con la conseguenza che la riduzione del numero complessivo dei casi non è stata, in alcuni Paesi, così marcata come ci si aspettava. Un problema nel problema è costituito dai ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* multifarmaco-resistenti (MDR, *multidrug resistance*), cioè resistenti ad almeno rifampicina e isoniazide. Secondo i dati dell'OMS i casi di tubercolosi MDR sono stati, nel 2010, circa 650.000 includendo sia quelli nuovi che quelli con precedente trattamento. I ceppi MDR sono diffusi ormai in tutti i Paesi; le stime indicano che il numero dei nuovi casi di tubercolosi MDR è relativamente stabile a livello globale e nella Regione delle Americhe, è in diminuzione nelle Regioni mediterranea orientale, asiatica sud-orientale e del Pacifico occidentale, ma è in aumento nelle Regioni africana ed europea (37).

Questa emergenza ha evidenziato la necessità di nuovi farmaci che possano sostituire gli attuali farmaci di seconda linea, spesso tossici e costosi. A tutt'oggi, il principale presidio strategico consiste nella prevenzione dell'insorgenza delle resistenze mediante un impegno attivo nell'assicurare la compliance del paziente.

Ad aggravare ulteriormente la situazione, di recente sono state segnalate epidemie da ceppi XDR (*extensive drug resistance*); si tratta di ceppi MDR resistenti anche ad almeno un chinolone e ad almeno un farmaco antitubercolare iniettabile (amikacina, kanamicina o capreomicina). Tali forme sono quasi sempre mortali e rappresentano una grave minaccia per il futuro specialmente nei Paesi ad alta endemia (15, 37); basti pensare che, già alla fine del 2011, erano ben 77 i Paesi in tutto il mondo, Italia compresa, in cui ne era stato riportato almeno un caso.

3.1.2. LA SITUAZIONE ITALIANA

La situazione epidemiologica della tubercolosi in Italia, definita dal sistema di notifica dei casi del Ministero della Salute, è caratterizzata da una bassa incidenza nella popolazione generale, dalla concentrazione della maggior parte dei casi in alcuni gruppi a rischio ed in alcune fasce di età e dall'emergere di ceppi tubercolari multiresistenti.

Secondo i dati più recenti, relativi al 2008, in tale anno sono stati notificati in Italia 4418 casi, con una diminuzione del 2,4% rispetto al 2007.

L'incidenza della tubercolosi in Italia nell'ultimo decennio si è mantenuta costantemente sotto i 10 casi/100.000 abitanti, cioè al di sotto della soglia che definisce un Paese "a bassa prevalenza", categoria nella quale rientra la maggior parte dei Paesi dell'Europa occidentale. Il quadro nazionale non desta particolare preoccupazione, sono presenti tuttavia notevoli differenze tra le varie Regioni sia nei tassi di incidenza che nei tassi aggregati per classi di età e nazionalità. Nel 2008, il 73% dei casi totali notificati proveniva da Lombardia, Lazio, Veneto, Emilia-Romagna e Piemonte, mentre le province di Roma e di Milano hanno notificato da sole il 25% dei casi nazionali totali. Le notifiche delle Regioni del Sud e delle Isole hanno raggiunto soltanto il 10%.

Nel 2008 il tasso standardizzato di incidenza è diminuito da 7,85 a 7,66/100.000 residenti, i valori di incidenza più alti si sono registrati in Lombardia (oltre 13/100.000 abitanti), seguita da Emilia-Romagna (11,4/100.000), Veneto e dalla Provincia autonoma di Bolzano.

Il tasso standardizzato medio di incidenza è stato, nell'ultimo decennio, di 9,6/100.000 per i maschi e 5,9/100.000 per le femmine. Nello stesso periodo si è osservata una progressiva diminuzione dell'incidenza negli ultra-sessantacinquenni; negli ultimi tre anni si è registrato un lieve e progressivo incremento nelle classi di età dai 15 ai 24 e dai 25 ai 64 anni e, nell'ultimo anno, un aumento nella classe fino a 14 anni, con un'incidenza maggiore nelle femmine rispetto ai maschi.

Nel 2008 il tasso grezzo di incidenza è stato di 3,8 casi su 100.000 per i nati in Italia e di 50-60/100.000 per i nati all'estero. Negli ultimi anni l'incidenza di tubercolosi polmonare è rimasta stabile, intorno ai 5-6 casi per 100.000 residenti. L'incidenza delle forme extrapolmonari, dopo un progressivo aumento nelle decadi precedenti, è sembrata stabilizzarsi a livello di 2 casi per 100.000 abitanti.

Nell'ultimo decennio il numero di casi di tubercolosi in persone nate all'estero è più che raddoppiato e ha raggiunto una frequenza percentuale del 46%. In generale, nonostante l'incidenza si sia ridotta negli ultimi anni, la popolazione immigrata ha ancora un rischio relativo di andare incontro a tubercolosi 10-15 volte superiore rispetto alla popolazione italiana. Nel 2008 quasi i due terzi dei casi di tubercolosi in stranieri sono stati notificati nel Nord Italia. Le classi di età maggiormente colpite sono tuttora quelle dei giovani adulti. Mentre sembra in costante diminuzione la proporzione dei casi di tubercolosi in persone provenienti dall'Africa, risulta in aumento quella dei soggetti provenienti dall'Est europeo. Alla popolazione proveniente dalla Romania è ascrivibile il maggior numero assoluto di casi di tubercolosi (oltre 500), con un tasso grezzo di incidenza di circa 80 casi per 100.000. I dati di incidenza per Paese di origine, pur essendo poco accurati per mancanza di informazioni certe sui denominatori, sembrano individuare nove nazionalità ad alto rischio, con tassi attorno a 100/100.000 residenti: Etiopia, Pakistan, Senegal, Perù, India, Costa d'Avorio, Eritrea, Nigeria e Bangladesh.

Nel 2006 il tasso di mortalità per tubercolosi è stato di 0,7/100.000 residenti. Circa il 55% dei deceduti erano maschi. Per quanto riguarda le classi di età, l'84,5% ha riguardato ultra-sessantacinquenni e il 18,9% soggetti con più di 85 anni. Nella classe di età fra i 25 e i 44 anni si è verificato il 3,5% dei decessi, mentre gli eventi letali al di sotto dei 25 anni sono stati molto rari.

La percentuale di tubercolosi multiresistente è lievemente aumentata nel 2008 rispetto al 2007, attestandosi al 3,7% del totale dei ceppi analizzati. Tra i nuovi casi la percentuale di MDR è risultata pari al 2,7%, in lieve ma costante aumento dal 2004. Nel 2008, la distribuzione dei ceppi MDR ha mostrato un picco nella classe di età fra i 15 e i 34 anni, ove si concentravano quasi il 50% degli MDR totali; al contrario i casi di tubercolosi non-MDR hanno interessato tutte le classi di età con una maggior concentrazione in quelle oltre i 55 anni. Per quanto riguarda i dati microbiologici, la coltura non era stata eseguita nel 12% dei casi notificati nel 2008, e il suo risultato non era noto nel 31,7%.

Nel 2007 hanno partecipato alla sorveglianza degli esiti del trattamento soltanto sette Regioni: Emilia-Romagna, Friuli Venezia Giulia, Lombardia, Marche, Piemonte, Toscana e Veneto; non ha partecipato nessuna Regione del Sud e delle Isole. Il numero di casi di tubercolosi polmonare in cui è stato monitorato l'esito è triplicato negli ultimi cinque anni, raggiungendo una copertura pari a circa il 90% nel 2006 e all'86,3% nel 2007. Nella coorte di notifica del 2007, solo il 66,8% dei casi sorvegliati ha avuto un esito favorevole, percentuale che rimane ben distante dal target dell'85% auspicato dall'OMS. Sempre nel 2007, un quarto dei casi di tubercolosi polmonare è stato perso al follow-up; tale quota sale a quasi il 29% prendendo in esame i casi di tubercolosi escreato-positiva. I soggetti

coinvolti erano prevalentemente di origine straniera, il che conferma la necessità di potenziare *case holding* e follow-up in questa fascia di popolazione.

Nell'ultimo decennio, mentre il numero totale dei casi di AIDS è notevolmente diminuito grazie all'introduzione delle terapie antiretrovirali, la percentuale di casi di AIDS riconosciuti al momento della diagnosi di tubercolosi è aumentata fino a raggiungere il 10% del totale. Il numero assoluto di casi di co-infezione e la proporzione sul totale dei casi di AIDS variano notevolmente tra le Regioni, con maggiore concentrazione in quelle più densamente popolate. Il 38% dei casi totali di tubercolosi/AIDS notificati nel periodo dal 1999 al 2008 si concentravano in Lombardia e nel Lazio. Negli ultimi anni si è registrato un aumento consistente dei casi di tubercolosi/AIDS nei soggetti stranieri, che hanno raggiunto nel 2007 il 70% del totale; le popolazioni maggiormente interessate sono quelle provenienti dal Continente africano, ma il rischio risulta aumentato anche per gli stranieri provenienti dagli altri Continenti. Valori assoluti molto bassi per quanto riguarda l'AIDS, associato o meno a tubercolosi, risultano per gli originari dal Continente asiatico, anche se probabilmente si tratta di artefatti dovuti a deficit diagnostici o di notifica in tali popolazioni (26).

Dai dati riportati emergono, nel nostro Paese, carenze per quanto riguarda:

- la diagnosi clinica: a causa della sintomatologia talora aspecifica e della scarsa conoscenza e percezione del problema tubercolosi da parte delle nuove generazioni di clinici, si determina spesso un ritardo diagnostico o una mancata diagnosi (4, 19, 20, 23, 31-33);
- la diagnosi microbiologica: caratterizzata da prestazioni non omogeneamente distribuite sul territorio nazionale e talora poco attendibili (30);
- la non aderenza agli obblighi di notifica;
- la mancata sorveglianza dell'esito del trattamento;
- la mancanza di dati epidemiologici nazionali relativi alle resistenze ai farmaci.

In conclusione, la malattia tubercolare è distribuita in modo eterogeneo sul territorio nazionale e si concentra in grandi aree urbane e poli di sviluppo industriale ove disagio sociale, infezione da HIV (soprattutto nei primi anni '90, prima dell'introduzione delle terapie antiretrovirali) e immigrazione sono più frequenti (35). Le forme XDR, seppur presenti, sono al momento del tutto sporadiche (37).

3.1.2.1. IL FENOMENO IMMIGRAZIONE

A differenza degli altri Paesi dell'Europa occidentale, e con l'esclusione dell'immigrazione dalle ex colonie del Corno d'Africa, l'Italia è divenuta solo di recente meta di flussi migratori importanti dai Paesi in via di sviluppo. Questo fenomeno, iniziato alla fine degli anni '80, è divenuto imponente negli ultimi anni. Gli Immigrati provenienti da Paesi ad alta endemia tubercolare arrivano spesso nel nostro Paese senza segni di malattia, ma con infezione tubercolare latente. Poiché la stessa immigrazione e il deterioramento delle condizioni socio-economiche e psicologiche ad essa conseguenti costituiscono fattori favorenti il passaggio dall'infezione latente alla malattia conclamata, si è registrato, fin dall'inizio degli anni '90, un aumento notevole dei nuovi casi di tubercolosi negli Immigrati, mediamente entro tre anni dall'arrivo, aumento che ha controbilanciato il calo di casi verificatosi tra gli Italiani. Recentemente, sono aumentati anche i casi di tubercolosi negli Immigrati residenti in Italia da più di tre anni.

Indagini epidemiologiche mediante genotipizzazione molecolare hanno dimostrato che la maggior parte delle infezioni negli Immigrati è stata contratta nel Paese di origine. D'altra parte, la

crescente integrazione degli Immigrati nelle proprie comunità etniche e in quella italiana ha portato alla comparsa di casi di trasmissione in loco (6, 16, 17).

Mentre per quanto riguarda il numero dei casi polmonari confermati batteriologicamente non c'è differenza fra Italiani e Immigrati, in questi ultimi le resistenze, in special modo all'isoniazide e le forme MDR, sono nettamente più frequenti.

In generale le forme extrapolmonari sono più rare negli Immigrati, con la sola eccezione dei casi di adenopatia (in quasi tutti i gruppi etnici) e delle forme ossee (specialmente nei Senegalesi).

Il successo della terapia è assai soddisfacente nei soggetti con situazione socio-economica stabile (il trattamento viene completato in oltre il 90% dei casi, valore paragonabile a quello relativo agli Italiani), mentre la percentuale scende, negli Immigrati senza permesso di soggiorno, al 75% (11).

3.2. CENNI DI ISTOPATOLOGIA

Necrosi caseosa, flogosi di tipo produttivo ed essudativo e concomitanti meccanismi di riparazione del danno tessutale costituiscono la risposta istopatologica a *Mycobacterium tuberculosis*.

È una risposta in continua e attenta modulazione, in relazione al delicato e mutevole equilibrio tra proprietà patogene del micobatterio e potenziale difensivo e aggressivo dell'ospite, reso più valido dall'eventuale ausilio terapeutico. La tubercolosi, per la sua molteplicità di pattern di interazione con i tessuti – i cui esiti e sequele risultano quanto mai diversi – e per la sua estrema variabilità nel tempo ha pochi eguali (18, 21, 22, 24, 28). Avvincente è studiarne gli aspetti istopatologici.

3.2.1. GRANULOMA TUBERCOLARE

Tipica risposta infiammatoria di tipo produttivo, atta a contenere l'azione patogena del micobatterio, è la formazione del granuloma tubercolare o tubercolo, da cui deriva il nome moderno della malattia, tubercolosi (fig. 3.1).

Elementi peculiari del tubercolo sono:

- gli aggregati di cellule epitelioidi, che sono cellule macrofagiche così denominate perché, “attivate” da citochine, vanno incontro a cambi metabolici e morfologici tali da farle assomigliare a cellule epiteliali;
- le cellule giganti multinucleate formatesi dalla fusione di più macrofagi, con nuclei scuri e piccoli, disposti più spesso tipicamente a corona alla periferia dell'ampio citoplasma (cellule giganti di Langhans);
- un vallo periferico di cellule linfoidi, rare plasmacellule e, tardivamente, fibroblasti più o meno numerosi;
- la caratteristica area centrale di necrosi coagulativa (morte cellulare) che coinvolge tessuto e cellule infiammatorie, ricca di materiale lipidico e priva di vasi, microscopicamente omogenea o finemente granulata.

Per il suo aspetto macroscopico, compatto, bianco-giallastro, che ricorda il formaggio, tale necrosi è detta “caseosa”. Nell'ambiente acido e anaerobio della necrosi, i micobatteri, aerobi stretti, non riescono a moltiplicarsi e vanno spesso incontro a morte; tuttavia alcuni possono sopravvivere e rimanere in stato di latenza anche per anni. La necrosi assume quindi significato di protezione nei confronti dell'in-

fezione, anche se ciò avviene a scapito di una più o meno estesa perdita di tessuto che può divenire clinicamente significativa. I granulomi, nei quali può prevalere la componente cellulare oppure quella necrotica, possono ingrandirsi e confluire, dando delle masse visibili macroscopicamente. Nel caso si verificano importanti fenomeni essudativo-necrotici, vi può essere colliquazione con successivo svuotamento del materiale necrotico all'esterno per via endocanalicolare (in organi quali polmone o rene), per contiguità (es. nel cavo pleurico) o tramite fistolizzazione (es. nei linfonodi).

Micobatteri possono essere rilevati in sezioni istologiche all'interno del granuloma con colorazione di Ziehl-Neelsen o a base di fluorocromi, tuttavia la sensibilità del metodo è piuttosto bassa.

Metodiche di biologia molecolare che hanno come target sequenze genomiche specifiche di *Mycobacterium tuberculosis* complex possono essere di ausilio per segnalare e/o confermare la presenza di micobatteri in sede di lesione.

3.2.2. TUBERCOLOSI PRIMARIA

Focolaio primario di infezione, linfadenite satellite e linfangite interposta costituiscono il complesso primario (di Ranke) come risposta alla prima infezione tubercolare nella/nel paziente mai venuto a contatto con il bacillo tubercolare. Il focolaio primario è di regola polmonare, ma il micobatterio può penetrare nell'organismo anche per via enterica (frequente prima dell'introduzione della pastorizzazione del latte e del controllo della tubercolosi bovina) o attraverso lesioni di continuità della cute. Nel polmone, il focolaio primario (di Ghon), situato tipicamente in sede sub-pleurica e in aree ad alta tensione di ossigeno quali quelle contigue alla scissura fra i lobi superiori e inferiori, va incontro a fugace essudazione endoalveolare seguita da necrosi caseosa di parenchima ed essudato. Nel linfonodo satellite viene a formarsi, in seguito ad acquisizione di risposta immunitaria cellulo-mediata, il classico granuloma con un'ampia zona di necrosi caseosa; più linfonodi possono essere coinvolti successivamente. Alcuni micobatteri dal complesso primario raggiungono comunque il torrente ematico, per erosione diretta di un vaso o per via linfatica, e possono disseminare in altre parti del polmone o in altri organi a distanza, i quali rispondono con formazione di granulomi. Sedi preferenziali sono rappresentate dagli apici polmonari, ad alta tensione di ossigeno (focolai apicali di Simon), dalla corteccia cerebrale, dalla corteccia renale e dalla metafisi delle ossa. La tubercolosi primaria è dunque da considerarsi un'infezione sistemica.

Nel 90-95% dei casi complesso primario e foci periferici vanno incontro a risoluzione spontanea, con riassorbimento parziale o totale della necrosi caseosa e susseguenti quadri di riparazione del danno tessutale con esiti in fibrosi e talora con calcificazione distrofica. Nei foci cicatriziali si possono annidare micobatteri silenti e tuttavia vitali, che costituiscono una potenziale fonte di riattivazione della malattia (infezione tubercolare latente). Nel restante 5-10%, specie in bambine/i in condizione di malnutrizione o in adulte/i severamente immunodepressi, vi è estensione del complesso primario con massiva caseificazione e colliquazione del focolaio di Ghon o, più spesso, dei linfonodi ilari (tubercolosi primaria progressiva).

Numerose, e talora gravi, possono essere le complicanze, quali:

- svuotamento del materiale caseoso del focolaio polmonare nel cavo pleurico (empiema pleurico) o nella vie aeree (con diffusione in altre aree del polmone), con conseguente formazione di lesioni cavitarie;
- compressione delle vie aeree da parte dei linfonodi ilari con conseguente atelettasia polmo-

nare o erosione in un bronco con coinvolgimento del parenchima polmonare corrispondente (epitubercolosi);

- fistolizzazione dei linfonodi caseificati all'interno dell'albero bronchiale con broncopolmonite e polmonite caseosa secondaria;
- erosione linfonodale in cavo pericardico (pericardite tubercolare).

Anche *foci* periferici localizzati in sede extrapolmonare possono evolvere in lesioni essudativo-necrotiche, dando origine a complicanze precoci, talora gravi, quali la meningite, o la malattia d'organo, spesso tubercolosi renale, ossea e articolare.

Altra temibile evenienza è la disseminazione dei micobatteri per via ematogena; il circolo viene raggiunto o per via linfatica, attraverso la vena cava superiore, o in seguito ad erosione diretta di parete vasale. Negli organi raggiunti dall'infezione, in sede parenchimale, si ha formazione di innumerevoli nodulini, – corrispondenti microscopicamente a granulomi –, isolati, bianco-giallastri, della grandezza di qualche millimetro, somiglianti a grani di miglio. Tale forma di tubercolosi è definita “miliare”, dal latino *milium*, miglio. Poiché vi è immissione di micobatteri anche nel circolo sistemico oltre che nel polmone (tubercolosi miliare polmonare), tubercoli miliarici possono essere presenti contemporaneamente anche in molti altri organi (tubercolosi miliare sistemica).

Sedi preferenziali sono costituite da milza, fegato, sierose, meningi, corioide, ove i tubercoli sono ben evidenziabili mediante l'esame del fondo oculare. Cuore, muscoli scheletrici, tiroide e pancreas, anche se non del tutto risparmiati, risultano invece i siti più refrattari. La tubercolosi miliare non è comunque da ritenersi segno di anergia immunologica in quanto le lesioni, a differenza di quelle della tubercolosi criptica disseminata dei/le pazienti severamente immunocompromessi, presentano una buona risposta granulomatosa.

3.2.3. TUBERCOLOSI POST-PRIMARIA

Il complesso primario rimane clinicamente silente nella maggior parte delle persone immuno-competenti, tuttavia in circa il 5-10% di esse, a distanza di tempo variabile – anche decenni –, si sviluppa una forma di malattia definita “tubercolosi post-primaria”, conosciuta anche come tubercolosi di tipo adulto o secondaria.

L'eziopatogenesi, oggetto storicamente di aspro dibattito, può essere ricondotta, come dimostrato dalle recenti indagini di genotipizzazione, sia a reinfezione esogena da nuovo ceppo tubercolare, sia a riattivazione endogena di bacilli tubercolari rimasti vitali nel complesso primario o, più frequentemente, in *foci* periferici raggiunti per via ematogena durante il periodo primario. Nel polmone, tali *foci* sono localizzati caratteristicamente all'apice (focolai di Simon). Indipendentemente dalla sede del complesso primario, per ragioni non ancora ben definite, la tubercolosi post-primaria tende ad avere come prima localizzazione proprio gli apici polmonari, ove vi è ampia produzione di necrosi caseosa. Meno coinvolti sono i linfonodi satelliti. Circa il 90% delle lesioni iniziali regredisce spontaneamente con esiti cicatriziali in sede apicale. Cicatrici di lesioni guarite sono riscontrabili nella maggior parte delle persone nate a cavallo tra il XIX e il XX secolo in Europa e negli Stati Uniti. Nel caso in cui la lesione evolva, la necrosi caseosa, talora massiva, va incontro a colliquazione. Il susseguente svuotamento del materiale necrotico per via endobronchiale o per contiguità nel cavo pleurico porta alla formazione di lesioni cavitarie (caverne), delimitate da tessuto fibroso e di granulazione e ricche all'interno di bacilli tubercolari in attiva replicazione (fig. 3.2).

Le complicanze, talora gravi, delle caverne, includono:

- perdita di aree anche estese di parenchima polmonare;
- disseminazione dei bacilli, per contiguità o per via endobronchiale, sia al polmone che ad altri organi, quali trachea e laringe e, in seguito a deglutizione dei micobatteri, all'apparato gastrointestinale;
- erosione dei vasi ematici con emottisi anche importante e talora mortale (nella superficie interna delle caverne decorrono vasi particolarmente fragili con microdilatazioni e scarso involucro fibroso: aneurismi di Rasmussen), che spiega come frequentemente l'emottisi sia tra i segni clinici della malattia tubercolare;
- emissione dei bacilli all'esterno, mediante goccioline di saliva, che vengono a costituire fonte diretta di contagio (tubercolosi aperta) e rappresentano il meccanismo evolutivo sviluppato da *Mycobacterium tuberculosis* per perpetuare la propria sopravvivenza.

La formazione di estese aree di necrosi caseosa, l'evoluzione cavitaria e la tendenza alla localizzazione della tubercolosi post-primaria costituiscono indici di buona risposta immunitaria. Nei pazienti gravemente immunodepressi vi sono infatti lesioni polmonari diffuse con scarsa tendenza alla cavitazione, spesso associate a linfadenopatia mediastinica e a diffusione sistemica della malattia.

Complessivamente, la tubercolosi post-primaria tende a rimanere più localizzata e circoscritta rispetto alla tubercolosi primaria progressiva. Anche nel caso si sviluppi tubercolosi miliare, quest'ultima è più spesso limitata al polmone ed è quindi meno grave e meno diffusa della forma miliare del periodo primario. Nonostante la maggior tendenza al contenimento della lesione in ambito polmonare, nella tubercolosi post-primaria vi è comunque immissione di bacilli tubercolari nel circolo sistemico con possibile localizzazione in organi a distanza, quali meningi, encefalo, surrene, rene, ossa, articolazioni, tube di Falloppio, epididimo, che possono divenire sede di malattia. Il quadro istopatologico presenta, a seconda dello stato immunitario del paziente, lesioni di tipo prevalentemente produttivo o essudativo-necrotico, con anche estese perdite di parenchima ed esiti e sequele clinicamente differenti a seconda dell'organo interessato.

Per quanto riguarda le ipotesi patogenetiche, la modalità di riattivazione dei micobatteri ha a lungo suscitato dibattito tra le/gli studiosi. Il ruolo esclusivo comunemente attribuito all'immunodepressione viene in recenti lavori ridimensionato (21). La tubercolosi post-primaria si sviluppa infatti più frequentemente e in modo più severo in giovani adulte/i immunocompetenti con una importante risposta all'intradermoreazione di Mantoux. Ciò potrebbe essere dovuto a un locale difetto dei macrofagi alveolari che, divenendo schiumosi per l'accumulo di lipidi e perdendo di conseguenza la capacità di uccidere i micobatteri, verrebbero a costituire "un santuario" di sopravvivenza per *Mycobacterium tuberculosis* in una/un ospite, d'altro canto, perfettamente immunocompetente (21). L'inizio del processo di necrosi caseosa è spesso associato a un esplosivo aumento del numero di micobatteri, supportando l'ipotesi che l'accumulo di prodotti micobatterici nei macrofagi alveolari preceda il processo caseoso. L'accumulo lipidico sarebbe favorito dall'ostruzione bronchiale e dagli acidi micolici di *Mycobacterium tuberculosis*. Inoltre, il trealosio 6,6' dimicolato (TDM) liberato dalla parete micobatterica diverrebbe, una volta associato a lipidi di superficie macrofagici, un potente immunogeno in grado di scatenare un'azione citotossica da parte dei linfociti T nei riguardi dei macrofagi stessi: a questo meccanismo sarebbero dovute l'estesa produzione di necrosi caseosa, la rapidità della formazione delle caverne e la rarità della loro guarigione spontanea (21).

L'immunodepressione e la giovane o la tarda età rappresentano sicuramente un fattore predisponente la disseminazione dell'infezione, tuttavia vi è minore tendenza alla formazione di caverne.

La tubercolosi post-primaria da *Mycobacterium tuberculosis* è il risultato dell'adattamento del germe alla longevità e allo stile di vita dell'ospite. L'infezione da *Mycobacterium bovis*, più aggressivo e incapace di dormienza, è, al contrario, responsabile di tubercolosi primaria molto severa e caratterizzata da manifestazioni clinico-patologiche peculiari; non vi è invece alcuna segnalazione in letteratura che tale infezione possa sfociare in tubercolosi post-primaria (21).

Una bella iconografia è disponibile presso il sito: http://www.granuloma.homestead.com/tuberculosis_index.html.

3.3.ASPETTI CLINICI

3.3.1.TUBERCOLOSI POLMONARE

3.3.1.1. SEGNI E SINTOMI

La fase iniziale della tubercolosi polmonare è solitamente asintomatica, spesso evidenziabile solo radiograficamente. Dei sintomi sistemici, la febbre è il più facilmente osservabile con una frequenza che varia approssimativamente dal 37% all'80%. La perdita di appetito, il calo ponderale, la debolezza, la sudorazione notturna e il malessere generale appaiono gradualmente; si tratta di segni molto comuni e difficili da correlare alla presenza di malattia tubercolare se non si tiene presente anche questa eventualità diagnostica.

La tosse, che è il sintomo più comune nelle prime fasi della malattia, può essere secca, ma in seguito, quando si instaurano l'infiammazione e la necrosi tissutale, diventa produttiva. La presenza di un escreato muco-purulento non è specifica, e la presenza di tosse e di escreato può venir sottovalutata in pazienti con bronchite cronica (7).

L'emottisi raramente costituisce il sintomo di presentazione della malattia, più spesso è indice di malattia pregressa e non è necessariamente legata a malattia attiva. Essa può essere conseguente a bronchiectasia post-tubercolare, a rottura di un vaso dilatato nella parete di una caverna (aneurisma di Rasmussen), a superinfezione batterica o micotica di una caverna (micetoma da *Aspergillus*) oppure a erosione della parete di una via aerea in presenza di una lesione calcifica (broncolitiasi).

Il dolore toracico è solitamente dovuto a un allargamento dell'infiammazione polmonare alla parete pleurica. La dispnea non è solitamente presente se non in caso di malattia estesa che può provocare una severa insufficienza respiratoria.

I segni fisici, all'esame obiettivo, solitamente non sono di grande aiuto nella definizione della diagnosi; si possono rilevare dei ronchi in corrispondenza dell'area coinvolta così come dei suoni di origine bronchiale in caso di lesioni polmonari consolidate.

L'anemia normocitica normocromica è presente in circa il 10% dei casi e nelle forme disseminate.

L'ipoalbuminemia e l'ipergammaglobulinemia sono manifestazioni comunemente associate a una malattia tubercolare avanzata. Il numero dei globuli bianchi è solitamente normale, ma talora può salire a 10.000-15.000 cellule/mm³. Monocitosi è presente in meno del 10% dei casi. Ematuria o piuria dovrebbero suggerire una coesistente localizzazione renale. Una iponatremia associata a una

inappropriata secrezione di ormone antidiuretico è una caratteristica della meningite tubercolare, ma talora può essere riscontrata in casi con solo interessamento polmonare. L'ipercalcemia è anche osservata in caso di tubercolosi polmonare, solitamente nella prima settimana di terapia.

In molti pazienti coesistono altre patologie, quali l'infezione da HIV, l'alcolismo, l'insufficienza renale cronica, il diabete mellito, le malattie neoplastiche, l'abuso di sostanze stupefacenti, solo per citarne alcune; per questo motivo i segni, i sintomi e le complicazioni delle patologie concomitanti possono oscurare o modificare quelli della tubercolosi e ritardarne considerevolmente la diagnosi (3, 29).

3.3.1.2. CARATTERISTICHE RADIOLOGICHE

La tubercolosi polmonare viene evidenziata precocemente alla radiografia del torace, tuttavia una lesione tubercolare endobronchiale può non essere associata ad alcun segno radiografico. I pazienti con infezione da HIV e tubercolosi polmonare spesso hanno, al contrario dei pazienti immunocompetenti, una radiografia toracica normale. La tubercolosi polmonare primaria si evidenzia più frequentemente, nelle zone media e inferiore, come un piccolo infiltrato associato spesso ad adenopatia ilare omolaterale. Nei bambini è comune l'atelettasia del lobo medio causata dalla compressione delle vie aeree ad opera di un linfonodo tumefatto.

Se il processo primario progredisce nonostante lo sviluppo dell'immunità cellulo-mediata, aumentano le probabilità che esiti in una lesione cavitaria (tubercolosi primaria progressiva).

La tubercolosi polmonare conseguente a riattivazione endogena di infezione latente si evidenzia solitamente mediante alterazioni localizzate all'apice di uno o entrambi i polmoni. I segmenti coinvolti più frequentemente sono l'apicale e il posteriore del lobo polmonare superiore destro e l'apicale posteriore del lobo polmonare sinistro.

L'adenopatia intratoracica è frequente nei bambini con infezione primaria, ma talvolta può essere presente anche nell'adulto immunocompetente con tubercolosi attiva (in particolare fra gli Immigrati).

Dal focolaio della lesione tubercolare il materiale infetto può diffondere lungo le vie aeree ad altri distretti polmonari manifestando, alla radiografia toracica, un quadro di broncopolmonite a focolai multipli (*patchy*).

Conseguentemente all'erosione diretta di un vaso ematico, o per via linfo-ematogena, l'infezione può disseminare evidenziando, radiograficamente, un quadro di tipo miliariforme.

Le caratteristiche radiologiche di una vecchia tubercolosi guarita si differenziano rispetto a quelle della malattia attiva. Le lesioni tubercolari guarite evidenziano cicatrici associate a riduzione del volume del parenchima polmonare e spesso a calcificazione. Noduli polmonari densi, associati o meno a calcificazioni, possono essere visibili in regione ilare o nei lobi superiori; noduli di dimensioni più contenute, con o senza segni di cicatrizzazione fibrotica, sono spesso evidenti nei lobi superiori. I noduli e le lesioni fibrotiche della tubercolosi guarita sono ben demarcati e caratterizzati da margini netti.

L'immagine radiologica di bronchiectasie in corrispondenza dei lobi superiori è un segno aspecifico, ma spesso conseguente a pregressa tubercolosi.

Le cicatrici pleuriche possono essere segno di pregressa malattia tubercolare, ma più comunemente sono conseguenti a infezioni aspecifiche o a traumi.

All'interno delle cicatrici fibrotiche e dei noduli polmonari sono contenuti dei bacilli tubercolari a basso tasso di replicazione che costituiscono un rischio potenziale per una futura progressione

verso la malattia tubercolare attiva. Le lesioni nodulari calcificate e gli ispessimenti pleurici mostrano un tasso di progressione verso la malattia attiva notevolmente inferiore.

3.3.2. TUBERCOLOSI EXTRAPOLMONARE

La tubercolosi extrapolmonare è solitamente più difficilmente diagnosticabile rispetto alla tubercolosi polmonare soprattutto perché, essendo meno comune, è meno familiare a molti clinici. Essa coinvolge solitamente organi e tessuti poco accessibili dove pochi bacilli provocano gravi danni (38).

3.3.2.1. TUBERCOLOSI DISSEMINATA

La tubercolosi disseminata è conseguente alla inadeguata risposta immunitaria dell'ospite nel controllo dell'infezione tubercolare latente o recentemente acquisita. Con molta probabilità, l'interessamento multiorgano si ha più frequentemente di quanto si creda, anche perché, una volta che il bacillo tubercolare è stato isolato da un campione, non è frequente che venga ricercato anche in campioni provenienti da altri siti corporei.

Si definisce "miliare" la tubercolosi polmonare caratterizzata dal quadro radiografico omonimo, dove il termine "miliare" è dovuto alla somiglianza delle lesioni con i grani di miglio; tali lesioni sono dei granulomi delle dimensioni di 1-2 mm.

Le manifestazioni cliniche della tubercolosi disseminata sono molteplici, i segni e i sintomi sono generalmente aspecifici, in particolare la febbre, il calo ponderale, la sudorazione notturna, l'anorexia e la debolezza; altri sintomi possono dipendere dalla severità della malattia e dagli organi colpiti.

La tosse produttiva è comune perché esiste spesso anche un coinvolgimento polmonare. La cefalea associata ad alterazioni dello stato mentale è di solito da imputare alla disseminazione meningea.

I segni sono anch'essi variabili: in ordine di frequenza si osservano febbre, dimagrimento, epatomegalia, segni polmonari, linfadenopatia e splenomegalia.

Un segno di disseminazione tubercolare è il riscontro di granulomi a livello della coroide.

La radiologia del torace è anormale nella maggior parte, ma non in tutti, i casi di tubercolosi disseminata. Approssimativamente nell'85% dei casi si osserva, al momento della diagnosi, una caratteristica disseminazione miliarica bilaterale che interessa prevalentemente i campi polmonari superiori. Altri riscontri radiografici possono includere infiltrati del lobo superiore con o senza cavitazione, effusione pleurica e pericardica.

3.3.2.2. TUBERCOLOSI LINFONODALE

È caratterizzata dalla tumefazione, non dolorosa, di uno o più linfonodi. Solitamente sono coinvolte le catene linfonodali latero-cervicali anteriori e/o posteriori o quelle delle fosse sovra-claveari; frequentemente il processo è bilaterale e possono essere coinvolti anche linfonodi non contigui.

Nelle fasi iniziali la nodulazione è discreta e la cute sovrastante non presenta alterazioni; successivamente le dimensioni del nodulo possono aumentare rendendo evidente una tumefazione sotto la cute notevolmente infiammata. Il linfonodo può colliquare con formazione di un tratto fistoloso a lenta guarigione. La linfadenopatia intratoracica può causare atelettasia da compressione di un bronco. L'agoaspirato o la resezione chirurgica di un linfonodo sono necessari per ottenere del materiale diagnostico in caso di normalità della radiografia toracica e in assenza di positività dell'escreato. Sia nei casi di localizzazione periferica che intratoracica delle lesioni linfonodali, le indagini di *imaging* (ecografia, TAC) dimostrano spesso tendenza alla confluenza e alla colliquazione centrale.

3.3.2.3. TUBERCOLOSI PLEURICA

Due sono i meccanismi mediante i quali lo spazio pleurico viene interessato dalla tubercolosi.

Le differenze nella patogenesi non solo determinano diversi quadri clinici, ma anche diversi approcci diagnostici e terapeutici e diverse sequele.

Nella prima varietà di coinvolgimento pleurico in corso di infezione tubercolare, pochi bacilli possono crearsi un varco verso lo spazio pleurico. La successiva risposta immunitaria cellulomediata provoca una risposta infiammatoria legata a un fenomeno di ipersensibilità; questo tipo di reazione pleurica non riveste grande importanza clinica e il processo si risolve spontaneamente. In alcuni pazienti, invece, il coinvolgimento pleurico è acuto, accompagnato da febbre e dolore; se il versamento è cospicuo si ha dispnea, tuttavia solitamente il liquido è scarso e raramente bilaterale. In circa il 30% dei casi il parenchima polmonare non è coinvolto.

La seconda varietà di coinvolgimento della pleura è l'empirama. Questa è una manifestazione meno comune causata dal travaso di un gran numero di bacilli tubercolari nello spazio pleurico, solitamente dovuto all'apertura di una lesione cavitaria polmonare o alla formazione di una fistola bronco-pleurica a partire da un *focus* tubercolare polmonare. L'empirama è frequentemente associato a tubercolosi polmonare; nei casi in cui non lo sia si rendono necessarie, per la diagnosi, la toracentesi e la biopsia pleurica.

3.3.2.4. TUBERCOLOSI GENITO-URINARIA

La sintomatologia locale predomina rispetto a quella sistemica; disuria, ematuria e pollachiuria sono comuni, talvolta associate a un dolore al fianco. I sintomi sono subdoli e quando si arriva a una diagnosi spesso il danno renale è avanzato. Nelle donne il coinvolgimento genitale è più frequente rispetto agli uomini ed è caratterizzato da irregolarità mestruale, algie pelviche e infertilità.

Nell'uomo, una massa scrotale non dolente o poco dolente costituisce la presentazione più frequente di tubercolosi genito-urinaria, anche se possono, in alcuni casi, essere associati sintomi di orchite, prostatite o epididimite. I soggetti con tubercolosi genito-urinaria sono generalmente asintomatici e la diagnosi viene fatta, in più del 90% dei casi, a seguito di esami routinari delle urine con valori anormali per la presenza di piuria e/o ematuria. In circa il 40-75% dei casi la tubercolosi genito-urinaria si accompagna ad anomalie del quadro radiografico del torace riferibili anche a esiti di lesioni precedenti e non necessariamente a malattia in atto.

3.3.2.5. TUBERCOLOSI OSTEO-ARTICOLARE

Il sintomo di presentazione della tubercolosi ossea è il dolore, spesso associato a tumefazione dell'articolazione coinvolta, a limitazione funzionale e talvolta a fistolizzazione.

Tutti i segmenti ossei possono essere coinvolti, ma è la parte spugnosa dell'osso, maggiormente vascolarizzata, quella prevalentemente interessata. A causa della natura subdola dei sintomi, spesso la diagnosi risulta tardiva con gravi conseguenze, in particolare nella tubercolosi vertebrale dove le sequele neurologiche della compressione del midollo spinale possono portare anche alla paraplegia.

Importante dal punto di vista diagnostico è l'esame radiologico che evidenzia l'erosione ossea, l'osteoporosi subcondrale e l'alterazione dello spazio articolare. In caso di spondilite (morbo di Pott), la TAC e la risonanza magnetica sono molto più sensibili della radiografia convenzionale nell'evidenziare le lesioni della colonna vertebrale.

3.3.2.6. TUBERCOLOSI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

La meningite tubercolare è il risultato della disseminazione dei micobatteri in corso di una batteriemia tubercolare. Può verificarsi in una fase precoce, in seguito a infezione tubercolare, o a causa della rottura di un vecchio focolaio parameningeo con disseminazione di micobatteri all'interno dello spazio subaracnoideo.

L'infezione tubercolare meningea è principalmente localizzata a livello della base dell'encefalo; i segni e i sintomi, oltre a quelli correlati all'interessamento dei nervi cranici, sono cefalea, riduzione del livello di coscienza o rigidità nucale.

Nel 50% dei casi, alla meningite tubercolare si associano alterazioni radiologiche toraciche corrispondenti a vecchi focolai tubercolari o a processi in corso, più spesso miliariformi.

Un'altra forma di tubercolosi del sistema nervoso centrale, anche se non frequente, è il tubercoloma, una lesione occupante spazio, singola o multipla, che di solito causa convulsioni e segni focali. Si presenta come una massa non vascolarizzata circondata da una zona edematosa.

In presenza di segni meningei all'esame fisico può essere eseguita, per scopi diagnostici, la puntura lombare. Se si osserva una sintomatologia di tipo focale o si sospetta una aumentata pressione intracranica, una TAC o una risonanza magnetica possono aiutare a chiarire il quadro clinico. Per una diagnosi certa è comunque necessaria la biopsia.

3.3.2.7. TUBERCOLOSI ADDOMINALE

La tubercolosi può interessare tutti gli organi intra-addominali nonché il peritoneo; le manifestazioni cliniche sono differenti a seconda delle aree coinvolte.

Più comunemente sono interessati l'ileo terminale e il cieco. Le manifestazioni cliniche più comuni sono il dolore, che può simulare una appendicite, e l'occlusione intestinale.

Frequentemente si pone la diagnosi differenziale con il carcinoma e spesso il dubbio viene chiarito solo in sede chirurgica.

Il dolore addominale e il rigonfiamento dell'addome sono i sintomi di presentazione della peritonite tubercolare. La febbre, la perdita di peso e l'anoressia sono pure comuni.

I sintomi della tubercolosi possono essere coperti dalle malattie concomitanti di cui spesso sono portatori questi pazienti, soprattutto la cirrosi epatica associata ad ascite. La combinazione di febbre e sintomatologia addominale in un soggetto con ascite dovrebbe sempre far sospettare un'infezione intra-addominale e suggerire l'esecuzione di paracentesi. Quando quest'ultima non è diagnostica è raccomandata la laparoscopia con biopsia.

3.3.2.8. TUBERCOLOSI PERICARDICA

La sintomatologia, i segni clinici e i dati di laboratorio (dolore, versamento e talvolta effetti emodinamici) sono, nella tubercolosi pericardica, difficilmente discriminabili da quelli di una pericardite aspecifica. I sintomi sistemici sono del tutto aspecifici, quelli di origine cardiopolmonare includono tosse, dispnea, ortopnea, edemi declivi e dolore toracico sordo, spesso acuito dalla posizione e dalla respirazione. A parte la febbre, i segni clinici più comuni sono indotti dal tamponamento cardiaco.

In assenza di malattia tubercolare extracardiaca per la diagnosi sono necessarie l'aspirazione del liquido pericardico o la biopsia pericardica.

3.4. LA TUBERCOLOSI LATENTE

Per “tubercolosi latente” si intende un’infezione da bacillo tubercolare in assenza di segni clinici, radiologici e batteriologici di malattia in atto.

3.4.1. DIAGNOSI DELLA TUBERCOLOSI LATENTE

3.4.1.1. IL TEST CUTANEO TUBERCOLINICO (INTRADERMOREAZIONE SECONDO MANTOUX)

Il test cutaneo tubercolinico eseguito con la tecnica secondo Mantoux è attualmente il metodo di riferimento per l’identificazione delle persone con infezione tubercolare (1, 5).

Il test tubercolinico è basato sul fatto che nell’infezione da *Mycobacterium tuberculosis* complex il sistema immunitario sviluppa una reazione da ipersensibilità di tipo ritardato ad alcune componenti del microrganismo che sono contenute in una miscela proteica, nota come “tubercolina”, ottenuta da colture di *Mycobacterium tuberculosis*.

Il test deve essere eseguito iniettando 0,1 mL, pari a 5 unità, di tubercolina standardizzata, denominata *Purified Protein Derivative* (PPD), per via intradermica nella superficie volare dell’avambraccio. Della tubercolina RT23 del Serum Institut di Copenhagen devono essere utilizzate 2 unità. Il test dovrebbe essere letto da 48 a 72 ore dopo l’iniezione, tuttavia le reazioni positive possono essere rilevate fino a una settimana dall’inoculo.

L’intensità della positività del test Mantoux è determinata misurando il diametro trasverso dell’infiltrato (fig. 3.3). Solamente la parte indurita, e non l’area eritematosa, deve essere misurata, preferibilmente col “test della penna” che garantisce una buona ripetibilità. La presenza di eritema in assenza di indurimento equivale ad un test negativo. Il risultato deve essere registrato in millimetri e non semplicemente come positivo o negativo.



Fig. 3.3 - LETTURA DELLA INTRADERMOREAZIONE SECONDO MANTOUX.

3.4.1.2. I TEST BASATI SUL RILASCIO DI INTERFERONE- γ PER LA DIAGNOSI DELL’INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

Da alcuni anni sono in commercio due test *in vitro* (T-SPOT.TB e QuantiFERON-TB Gold) che rappresentano un promettente, seppur non definitivo, sviluppo nella diagnostica dell’infezione tubercolare latente. Questi test, tecnicamente non identici, si basano sulla capacità dei linfociti T specifici attivati (presenti solo se il soggetto è venuto in contatto in precedenza col bacillo tuber-

colare) di rilasciare interferone- γ in presenza di antigeni specifici di *Mycobacterium tuberculosis*. Tali test non cross-reagiscono né con *Mycobacterium bovis* BCG, né con la maggior parte dei micobatteri non tubercolari, cosicché risultano negativi nei soggetti non infettati dal bacillo tubercolare, anche se vaccinati. Non sono in grado di distinguere un'infezione remota da una recente, né l'infezione latente dalla malattia attiva.

Entrambi i test sono approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e, nelle linee guida pubblicate dai Centers for Disease Control and Prevention di Atlanta (8), sono considerati quali valide alternative al classico test cutaneo. Entrambi sono approvati anche dal National Institute for Health and Clinical Excellence (27). Nelle linee guida britanniche viene tuttavia raccomandata una strategia a due livelli, con l'utilizzo dell'intradermoreazione di Mantoux come test di screening, e il ricorso ai test basati sul rilascio di interferone- γ solo per confermare un risultato positivo o inattendibile del test di screening. Tale strategia è stata adottata in Europa e in Italia (5, 12, 14), ma tali protocolli sono ancora fonte di discussione sia per quanto riguarda gli aspetti clinici che quelli economici, e necessitano pertanto di ulteriori valutazioni (13).

Universalmente accettato è comunque che il valore di tali test nella pratica clinica non possa prescindere dalla valutazione di fattori di rischio quale, ad esempio, l'esposizione all'agente infettivo.

3.4.2. IL TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

La terapia della tubercolosi latente riduce sostanzialmente il rischio che l'infezione progredisca allo stadio di malattia ed è oggi considerata la misura più efficace per il contenimento e, in prospettiva, per l'eliminazione della malattia tubercolare.

I soggetti con diametro del test tubercolinico ≥ 5 e < 10 mm devono essere considerati a rischio di progressione a malattia tubercolare e trattati, se:

- HIV-positivi;
- contatti recenti di un caso di tubercolosi bacillifera;
- presentano all'esame radiografico del torace lesioni fibrotiche compatibili con pregressa tubercolosi;
- trapiantati o in terapia immunosoppressiva.

I soggetti con diametro del test tubercolinico ≥ 10 e < 15 mm devono essere trattati se:

- provenienti, e arrivati da meno di 5 anni, da Paesi ove la tubercolosi è endemica;
- consumatori di droghe per via endovenosa;
- appartenenti a comunità ad alto rischio (carceri, case di riposo, dormitori pubblici, ospedali ed altre strutture sanitarie);
- operanti in laboratori di microbiologia;
- affetti da: diabete mellito scompensato, linfoma, carcinoma della testa e del collo o carcinoma in fase metastatica, leucemia, silicosi, malattia renale in fase terminale, patologie associate a perdita di peso o a terapia immunosoppressiva;
- bambini con età inferiore a quattro anni o adolescenti esposti ad adulti ad alto rischio.

L'isoniazide è il farmaco di prima scelta per il trattamento dell'infezione tubercolare latente. Il trattamento standard con isoniazide prevede una somministrazione giornaliera per nove mesi. Questo regime si è dimostrato particolarmente efficace ed è quello preferenziale per i pazienti sieropositivi per HIV o immunodepressi per altri motivi e per i bambini dai 2 agli 11 anni di età.

Un regime con isoniazide per sei mesi fornisce comunque una sostanziale protezione e rappresenta una valida alternativa. Sia il regime a nove mesi che quello a sei mesi con isoniazide possono essere intrapresi in modo intermittente (due volte la settimana) a condizione che la terapia sia direttamente osservata (DOT). Un'alternativa possibile è l'utilizzo della rifampicina, con somministrazione giornaliera per quattro mesi, come illustrato in tabella 1.

Tab. 1 - REGIMI DI TRATTAMENTO DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE.

Farmaco/Dose	Frequenza/Durata	Valutazione (Evidenza) ^{ab}	
		HIV-negativi	HIV-positivi
Isoniazide Adulti: 5 mg/kg Bambini: 10-20 mg/kg Dose massima: 300 mg	giornalmente per 9 mesi	A (II)	A (II)
Regimi alternativi			
Isoniazide^c Adulti: 15 mg/kg Bambini: 20-40 mg/kg Dose massima: 900 mg	2 volte la settimana per 9 mesi	B (II)	B (II)
Isoniazide Adulti: 5 mg/kg Bambini: non raccomandato Dose massima: 300 mg	giornalmente per 6 mesi	B (I)	C (I)
Isoniazide^c Adulti: 15 mg/kg Bambini: non raccomandato Dose massima: 900 mg	2 volte la settimana per 6 mesi	B (II)	C (I)
Rifampicina^d Adulti: 10 mg/kg Bambini: 10-20 mg/kg Dose massima: 600 mg	giornalmente per 4 mesi	B (II)	B (III)
<p>^a Forza della raccomandazione (A: preferita; B: alternativa accettabile; C: scelta quando A e B non sono utilizzabili).</p> <p>^b Qualità dell'evidenza che supporta le raccomandazioni (I: dati da trial clinici randomizzati; II: dati da trial clinici non randomizzati o condotti in altre popolazioni; III: opinioni di esperti).</p> <p>^c Utilizzo come terapia direttamente osservata (DOT).</p> <p>^d Controindicata nei soggetti HIV-positivi che assumono inibitori delle proteasi.</p>			

Le controindicazioni alla terapia con isoniazide includono:

- casi di contatto con paziente affetto da tubercolosi resistente all'isoniazide;
- storia di reazioni avverse al farmaco, sia epatiche che cutanee, allergia, neuropatia o altro;
- malattia epatica cronica;
- gravi malattie neuropsichiche;
- gravidanza (sebbene non sia mai stato registrato alcun effetto nocivo a carico del feto).

Nel caso in cui il paziente sia intollerante all'isoniazide o sia il contatto di un caso resistente ad essa, il trattamento preventivo può essere eseguito con rifampicina per quattro mesi.

Un ulteriore schema terapeutico proposto recentemente prevede la somministrazione settimanale, come DOT, dell'associazione di isoniazide (15 mg/kg, fino ad un massimo di 900 mg) con rifampicina (dosaggio di 750 mg per peso compreso fra 32 e 50 kg; dosaggio 900 mg per peso >50 kg), per un periodo di tre mesi. Tale associazione non è approvata per i bambini al di sotto dei 12 anni (10).

Altri protocolli che prevedono l'utilizzo di rifampicina alla dose 10 mg/kg fino a 600 mg/die, associata a pirazinamide con un dosaggio di 15-20 mg/kg fino a un massimo di 2 g/die per due mesi, sono da evitare (9, 10, 34).

3.5. PRINCIPI DI TERAPIA DELLA MALATTIA TUBERCOLARE

La tubercolosi deve essere trattata per almeno sei mesi. Un trattamento discontinuo o limitato a un periodo di tempo troppo breve risulta inefficace poiché i bacilli possono sopravvivere e la malattia non risolversi; esso rappresenta inoltre un fattore di rischio per lo sviluppo di resistenza ai farmaci.

Il regime di trattamento della tubercolosi deve prevedere l'associazione di più farmaci ai quali il microrganismo sia sensibile, dato che la monoterapia dà origine allo sviluppo di una popolazione batterica resistente. Nella tabella 2 sono riportati gli schemi terapeutici standard dettati dall'OMS per le diverse categorie di pazienti (36).

Tab. 2 - SCHEMI TERAPEUTICI STANDARD SECONDO L'OMS (36)^a.

	Fase di attacco	Fase di mantenimento
Casi di primo accertamento	HRZE per 2 mesi	HR per 4 mesi
	HRZE per 2 mesi	HRE ^b per 4 mesi
Recidive/fallimento terapeutico ^c	HRZES per 2 mesi	HRZE per 1 mese/HRE per 5 mesi
Recidive/fallimento terapeutico ^d	Invio a Centro di Riferimento per regime MDR empirico	Il regime terapeutico può essere modificato dopo test di sensibilità

^a H, isoniazide; R, rifampicina; Z, pirazinamide; E, etambutolo; S, streptomina.

^b Applicabile solo in Paesi con alti livelli di resistenza all'isoniazide nei nuovi pazienti con tubercolosi, quando il test di sensibilità all'isoniazide nei nuovi pazienti non è stato fatto, o i risultati non sono disponibili prima dell'inizio della fase di mantenimento.

^c Quando la probabilità di ceppo MDR sia media o bassa.

^d Quando la probabilità di ceppo MDR sia elevata.

In generale, vista la rarità dei casi di tubercolosi nella popolazione, è opportuno indirizzare il paziente, anche in assenza di complicanze, a un centro specializzato nella gestione della terapia e delle eventuali reazioni avverse ai farmaci.

La terapia della tubercolosi polmonare, in assenza di complicazioni, prevede un periodo iniziale di due mesi a base di isoniazide, rifampicina, pirazinamide ed etambutolo, in attesa del risultato dell'antibiogramma. In presenza di sensibilità a rifampicina e isoniazide la seconda fase del trattamento può essere basata sull'utilizzo di questi due soli farmaci per altri quattro mesi.

Il trattamento della tubercolosi associata all'infezione da HIV è più complesso, e la cura di questi pazienti deve essere affidata o eseguita in consulenza con gli esperti nel trattamento di tali patologie.

La tubercolosi extrapolmonare, nella maggior parte dei casi, può essere trattata con gli stessi schemi terapeutici della tubercolosi polmonare; la tubercolosi ossea, la miliare o la meningite tubercolare devono essere trattate almeno per 9-12 mesi.

I bambini devono essere sottoposti agli stessi regimi terapeutici degli adulti; per quanto riguarda i neonati il trattamento deve essere intrapreso il più presto possibile.

3.5.1. MANAGEMENT DEL CASO E PROBLEMATICHE OSPEDALIERE

L'ospedalizzazione dei malati di tubercolosi non è necessaria se non a seguito della gravità del quadro clinico o per motivazioni sociali. L'aderenza al trattamento fin dalle prime fasi può essere garantita, anche nei soggetti con tubercolosi polmonare bacillifera, da appropriate strutture sanitarie presenti sul territorio. Per quanto riguarda il contagio familiare, al momento della diagnosi e dell'impostazione della terapia è probabile che la trasmissione ai contatti sia già avvenuta, e semplici misure igieniche possono prevenire ulteriori contagi, possibili peraltro soltanto nei primi giorni di terapia.

Particolarmente importante è la prevenzione della trasmissione intranosocomiale della tubercolosi polmonare da parte di soggetti bacilliferi ad altri degenti o al personale sanitario. Le misure di prevenzione più efficaci sono rappresentate dall'identificazione precoce e dall'isolamento dei casi di malattia polmonare bacillifera. È indicato, sebbene difficilmente applicabile a causa della limitata disponibilità di posti letto, l'isolamento preventivo dei soggetti a rischio, in attesa del risultato dell'esame microscopico. I soggetti isolati dovrebbero essere alloggiati in camere singole, dotate di anticamera e di bagno proprio, possibilmente provviste di sistema di mantenimento della pressione negativa rispetto agli spazi esterni. La durata ottimale dell'isolamento è oggetto di discussione: esso dovrebbe protrarsi fino alla negativizzazione dell'esame microscopico dell'escreato e, come minimo, fino al completamento delle prime due settimane di trattamento supervisionato, sempre che sia stata esclusa l'infezione da ceppi multiresistenti.

La protezione del personale sanitario si basa, oltre che sulle misure sopra menzionate, sull'adozione di idonei apparati facciali di tipo FFP3 (non di semplici mascherine chirurgiche) al momento dell'ingresso nelle stanze ad isolamento respiratorio, e sul controllo periodico dell'infezione tubercolare latente (25). Per il personale sanitario è indicata la terapia preventiva in presenza di cuti-conversione.

Dal 2001 l'impiego della vaccinazione per il personale sanitario è indicato soltanto in casi particolari (vedi DPR 465, 2001).

Operatori sanitari con deficit del sistema immunitario, quindi con predisposizione allo sviluppo della malattia tubercolare una volta infettati da *Mycobacterium tuberculosis*, non dovrebbero prestare servizio in reparti in cui sia elevata la probabilità di degenza di malati con tubercolosi polmonare bacillifera.

3.5.2. MONITORAGGIO DELLE REAZIONI AVVERSE

Prima dell'inizio della terapia antibiotica è necessario sottoporre il paziente al controllo dei seguenti parametri: enzimi epatici, bilirubinemia, creatininemia, azotemia, nonché emocromo con formula e conta delle piastrine. Devono essere inoltre eseguiti: un esame dell'acuità visiva, qualora si intenda utilizzare l'etambutolo, un esame audiometrico, in caso di impiego di streptomina e il dosaggio dell'uricemia prima di utilizzare la pirazinamide.

I pazienti in trattamento con isoniazide, rifampicina o pirazinamide devono essere istruiti opportunamente in modo che possano interrompere immediatamente la terapia in caso di comparsa di sintomi correlabili all'epatite.

La neuropatia periferica è associata all'utilizzo di isoniazide. La rifampicina può accelerare la clearance dei farmaci metabolizzati a livello epatico come il metadone, i dicumarolici, i glucocorticoidi, gli estrogeni, gli ipoglicemizzanti orali, la digitale, gli anticonvulsivanti, alcuni antimicotici, la ciclosporina, gli inibitori delle proteasi e i contraccettivi orali.

L'iperuricemia può essere riscontrata in corso di terapia con pirazinamide, anche se la gotta è infrequente. La streptomina è ototossica e nefrotossica, la terapia deve essere immediatamente interrotta in casi di vertigine, stordimento e atassia. La neurite ottica è il più frequente e serio evento avverso della terapia con etambutolo.

3.5.3. FOLLOW-UP

I pazienti vanno sottoposti a monitoraggio microbiologico fino alla conversione dell'esame microscopico dell'espettorato da positivo a negativo.

Se dopo tre mesi di terapia le colture sono ancora positive o i sintomi non si risolvono bisogna prendere in considerazione l'ipotesi della resistenza ai farmaci o della mancata aderenza del paziente al trattamento farmacologico (2).

La valutazione radiografica durante il trattamento è meno importante rispetto all'esame dell'espettorato, in ogni caso una radiografia del torace alla fine della terapia è utile come metro di paragone con eventuali futuri esami radiologici. In caso di pronta e soddisfacente risposta dal punto di vista clinico e batteriologico sono sufficienti due visite di controllo, a tre e a nove mesi dal termine della terapia.

I pazienti devono essere istruiti a riconoscere e a riferire prontamente la comparsa di ogni sintomo riferibile a una riattivazione della malattia, quali ad esempio tosse prolungata, febbre, perdita di peso.

3.6. CONCLUSIONI

Sulla base di quanto sopra esposto, la tubercolosi, pur non rappresentando nel nostro Paese una vera emergenza sanitaria, non deve essere considerata una malattia debellata e da dimenticare.

La stretta collaborazione fra clinico e microbiologo può garantire una diagnosi tempestiva e una terapia efficace, entrambi cruciali per la strategia di eliminazione della malattia.

Purtroppo il disinteresse politico per questo tipo di malattia, ritenuta ormai debellata, e l'incornguenza del sistema di controllo che tende sempre più a parcellizzarsi con una drammatica dispersione delle competenze e delle informazioni, rendono la tubercolosi un fenomeno temibile soprattutto in previsione dell'aumento di immigrazione nel nostro Paese.

BIBLIOGRAFIA

1. ATS, CDC, Council of the Infectious Disease Society of America, *Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children*, 2000, *Am J Respir Crit Care Med*; 161:1376-1395.
2. ATS, CDC, IDSA, *Treatment of tuberculosis*, 2003, *MMWR*; 52:1-77.
3. Alisjahbana B., Sahiratmadja E., Nelwan E.J., Purwa A.M., Ahmad Y., Ottenhoff T.H., Nelwan R.H., Parwati I., van der Meer J.W., van Crevel R., *The effect of type 2 diabetes mellitus on the presentation and treatment response of pulmonary tuberculosis*, 2007, *Clin Infect Dis*; 45:428-435.
4. Asch S., Leake B., Anderson R., Gelberg L., *Why do symptomatic patients delay obtaining care for tuberculosis?*, 1998, *Am J Respir Crit Care Med*; 157:1244-1248.
5. Autori Vari, *Aggiornamento delle raccomandazioni per le attività di controllo della tubercolosi*, 2009, Ministero della Salute, Roma.
6. Bandera A., Gori A., Catozzi L., Esposti A.D., Marchetti G., Molteni C., Ferrario G., Codecasa L., Penati V., Matteelli A., Franzetti F., *Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis*, 2001, *J Clin Microbiol*; 39:2213-2218.
7. CDC, *Core curriculum on tuberculosis. What the clinician should know*, 2000.
8. CDC, *Updated guidelines for using Interferon Gamma release assay to detect Mycobacterium tuberculosis infection*, United States, 2010, *MMWR*; 59:1-25.
9. CDC, *Update: adverse event data and revised ATS/CDC recommendations against the use of rifampin and pyrazinamide for the treatment of latent tuberculosis infection*, United States, 2005, *MMWR*; 52:735-739.
10. CDC, *Recommendations for use of an isoniazid-rifapentine regimen with direct observation to treat latent Mycobacterium tuberculosis infection*, 2011, *MMWR*; 60:650-653.
11. Codecasa L.R., Porretta A.D., Gori A., Franzetti F., Degli Esposti A., Lizioli A., Carreri V., di Proietto M.C., Peroziello F., Besozzi G., *Tuberculosis among immigrants from developing countries in the province of Milan*, 1999, *Int J Tuberc Lung Dis*; 3:589-595.
12. Davies P.D., Drobniewski F., *The use of interferon-gamma-based blood tests for the detection of latent tuberculosis infection*, 2006, *Eur Respir J*; 28:1-3.
13. Denkinger C.M., Dheda K., Pai M., *Guidelines on interferon- γ release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion?*, 2011, *Clin Microbiol Infect*; 17:806-814.
14. Dinnes J., Deeks J., Kunst H., Gibson A., Cummins E., Waugh N., Drobniewski F., Lalvani A., *A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection*, 2007, *Health Technol Assess*; 11:1-196.
15. Dukes Hamilton C., Sterling T., Blumberg H.M., Leonard M., McAuley J., Schlossberg D., Stout J., Huitt G., *Extensively drug-resistant tuberculosis: are we learning from history or repeating it?*, 2007, *Clin Infect Dis*; 45:338-342.
16. Franzetti F., Codecasa L., Matteelli A., degli Espositi A., Bandera A., Lacchini C., Lombardi A., Pinsi G., Zanini F., El-Hamad I., Gori A., *Genotyping analyses of tuberculosis transmission among immigrant residents in Italy*, 2010, *Clin Microbiol Infect*; 16:1149-1154.

17. Garzelli C., Lari N., Cuccu B., Tortoli E., Rindi L., *Impact of immigration on tuberculosis in a low-incidence area of Italy: a molecular epidemiological approach*, 2010, *Clin Microbiol Infect*; 16:1691-1697.
18. Grange J.M., *Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis*, 129-152, in: Davies PDO. Ed., *Clinical tuberculosis*, 1998, Chapman & Hall, London.
19. Greenaway C., Menzies D., Fanning A., Grewal R., Yuan L., Mark F.J., *Delay in diagnosis among hospitalized patients with active tuberculosis-predictors and outcomes*, 2002, *Am J Respir Crit Care Med*; 165:927-933.
20. Güneylioglu D., Yilmaz A., Bilgin S., Bayram U., Akkaya E., *Factors affecting delays in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis in a tertiary care hospital in Istanbul, Turkey*, 2004, *Med Sci Monit*; 10:CR62-CR67.
21. Hunter R.L., *Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review*, 2011, *Tuberculosis*; 91:497-509.
22. Lanza G., *Tubercolosi polmonare*, 1345-1394, in: Lanza G. Ed., *Anatomia patologica sistematica*, 1985, Piccin, Padova.
23. Long R., Zielinski M., Kunimoto D., Manfreda J., *The emergency department is a determinant point of contact of tuberculosis patients prior to diagnosis*, 2002, *Int J Tuberc Lung Dis*; 6:332-339.
24. Lucas S.B., *Histopathology*, 113-127, in: Davies PDO. Ed., *Clinical tuberculosis*, 1998, Chapman & Hall, London.
25. Menzies D., Joshi R., Pai M., Comstock G., *Risk of tuberculosis infection and disease associated with work in health care settings*, 2007, *Int J Tuberc Lung Dis*; 11:593-605.
26. Ministero della salute, *Rapporto: La tubercolosi in Italia. Anno 2008*, Ministero della salute, Roma.
27. NICE, *Clinical guideline 117 Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*, 2011.
28. Ninfo V., *Tubercolosi polmonare*, 108-114, in: Ninfo V., *Lezioni di anatomia ed istologia patologica. Patologia dell'apparato respiratorio*, 1982, Unicopli, Milano.
29. Pérez-Guzmán C., Vargas M.H., Torres-Cruz A., Villarreal-Velarde H., *Does aging modify pulmonary tuberculosis? A meta-analytical review*, 1999, *Chest*; 116:961-967.
30. Piersimoni C., Mandler F., Marchetti D., Molinari G.L., Riva R., Tortoli E., Tronci M., Scarparo C., *Mycobacterial testing in hospital laboratories: results from a questionnaire survey in Italy*, 2004, *Clin Microbiol Infect*; 10:1014-1017.
31. Rao V.K., Iademaro E.P., Fraser V.J., Kollef M.H., *Delays in the suspicion and treatment of tuberculosis among hospitalized patients*, 1999, *Ann Intern Med*; 130:402-411.
32. Richeldi L., Ewer K., Losi M., Bergamini B.M., Roversi P., Deeks J., Fabbri L.M., Lalvani A., *T Cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection following brief exposure*, 2004, *Am J Respir Crit Care Med*; 170:288-295.
33. Sanz B., Blasco T., *Variables associated with diagnostic delay in immigrant groups with tuberculosis in Madrid*, 2007, *Int J Tuberc Lung Dis*; 11:639-646.
34. Tortajada C., Martinez-Lacasa J., Sanchez F., Jimenez-Fuentes A., De Souza M.L., Garcia J.F., Martinez J.A., Cayla J.A., *Is the combination of pyrazinamide plus rifampicin safe for treating latent tuberculosis infection in persons not infected by the human immunodeficiency virus?*, 2005, *Int J Tuberc Lung Dis*; 9:276-281.
35. Trébucq A., *Tuberculosis and big cities*, 2007, *Int J Tuberc Lung Dis*; 11:709.

36. WHO, *Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes*, 2009, WHO, Geneva.
37. WHO, *Global tuberculosis control*, WHO report 2011, WHO, Geneva.
38. Yang Z., Kong Y., Wilson F., Foxman B., Fowler A.H., Marrs C.F., Cave M.D., Bates J.H., *Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis*, 2004, *Clin Infect Dis*; 38:199-205.

Capitolo 4

LE INFEZIONI DA MICOBATTERI NON TUBERCOLARI

**Enrico Tortoli,
Claudio Piersimoni**

4. LE INFEZIONI DA MICOBATTERI NON TUBERCOLARI

Si definiscono “micobatteri non tubercolari” (MNT o NTM, in inglese) i micobatteri che non appartengono né al *Mycobacterium tuberculosis* complex né alla specie *Mycobacterium leprae*.

Le differenze fra il *Mycobacterium tuberculosis* complex e i MNT risiedono principalmente nella patogenicità, nell'habitat, nella contagiosità e nella sensibilità ai chemioterapici (44, 147). Sebbene i MNT siano prepotentemente saliti alla ribalta solo in seguito alla pandemia di HIV, iniziarono ad essere riconosciuti come patogeni negli anni '50 in seguito al rapido declino della tubercolosi conseguente alla scoperta dei farmaci antitubercolari.

L'approccio tassonomico ai MNT è passato attraverso due fasi: la prima, che potremmo definire “fenotipica”, si è sviluppata negli anni '50 e ha portato alla storica classificazione di Runyon. Quest'ultimo suddivise i MNT in base alla velocità di crescita e alla presenza o assenza di pigmentazione delle colonie. La seconda fase, che potremmo chiamare “genotipica”, è iniziata negli anni '90 con gli studi della sequenza del gene codificante per il DNA ribosomiale 16S. Il maggior potere discriminante dell'approccio genetico ha consentito la scoperta di numerose nuove specie micobatteriche (19, 64, 120). Al momento attuale gran parte della letteratura dedicata al significato clinico delle nuove specie è ancora di tipo aneddotico e non esistono protocolli terapeutici standardizzati.

4.1. EPIDEMIOLOGIA E PATOGENICITÀ

I MNT sono ubiquitari, possono essere isolati dalle acque e dal suolo e sono in grado di causare infezione in vari tessuti. Allo stato attuale delle conoscenze la trasmissione diretta interumana viene esclusa; quando infatti si registrano più casi di malattia nella stessa famiglia è sempre presente una fonte comune di contagio. Non vi è evidenza alcuna di possibili vettori, né è stata dimostrata una trasmissione diretta dagli animali all'uomo (44). La tesi maggiormente accreditata depone per una trasmissione dall'ambiente, soprattutto dalle acque, che costituirebbero il serbatoio delle infezioni da *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium simiae* e della maggior parte dei micobatteri a rapida crescita responsabili di epidemie intraospedaliere. In assenza di trasmissione diretta interumana, è verosimile che le infezioni polmonari siano acquisite, da soggetti affetti da patologie predisponenti, attraverso l'inalazione di aerosol ambientali contenenti l'agente infettante (24).

Differente è il caso delle linfadeniti infantili e delle infezioni superficiali (cute e tessuti molli), in cui la via di ingresso è costituita dalla cavità orale, nel primo caso, e dall'inoculazione diretta, traumatica o iatrogena, nel secondo.

Nei pazienti affetti da AIDS le infezioni disseminate da MNT insorgono previa colonizzazione transitoria dei tratti respiratorio e/o digerente.

Recenti dati epidemiologici mostrano considerevoli variazioni di prevalenza dei MNT che vengono comunque isolati con sempre maggior frequenza. È ormai chiaro che la pandemia di HIV e una più accurata diagnosi di laboratorio, anche se non possono essere considerate le uniche responsabili, hanno avuto un ruolo rilevante in tale tendenza.

Molto rimane ancora da conoscere riguardo alla patogenicità delle infezioni da MNT. La maggior parte di questi microrganismi mostra di possedere un potere patogeno *borderline*. Dal momento che essi sono ubiquitari e possono colonizzare le mucose dell'uomo anche per lungo tempo, è fondamentale l'individuazione delle condizioni in grado di innescare la malattia. Certamente rientrano fra tali condizioni: la dose infettante, la colonizzazione da lunga data e le alterazioni del sistema immunitario (locali o sistemiche, temporanee o permanenti).

Nella maggior parte dei casi di malattia polmonare in soggetti immunocompetenti si può documentare una preesistente patologia cronico-degenerativa dell'apparato respiratorio (149). In questi pazienti non è facile capire quale sia il confine fra colonizzazione permanente e malattia vera e propria, tanto che alcuni Autori preferiscono sostituire il termine "colonizzazione" con "malattia indolente" (46).

4.2. INFEZIONI POLMONARI

Il tratto respiratorio rappresenta il bersaglio preferito delle infezioni da MNT. Responsabili di infezioni polmonari possono essere micobatteri sia a lenta crescita che a rapida crescita. Sebbene la patologia respiratoria da MNT possa presentarsi con un ampio ventaglio di quadri clinico-radiologici, quello di gran lunga più frequente è la pneumopatia cronica localizzata del paziente anziano. I bambini, fatta eccezione per i soggetti affetti da fibrosi cistica, sono invece colpiti molto raramente da questo tipo di malattia. La quasi totalità dei pazienti è costituita da individui con preesistenti patologie polmonari di tipo restrittivo od ostruttivo, le quali creano un ambiente favorevole per la colonizzazione e la successiva malattia invasiva. Queste condizioni predisponenti comprendono la pneumoconiosi, le cicatrici polmonari secondarie a infezioni croniche quali tubercolosi o micosi, la bronchite cronica enfisematosa (spesso associata a tabagismo di lunga data) e le bronchiectasie. Meno frequentemente i fattori predisponenti includono pneumopatia bollosa, interstiziopatia cronica, malformazioni della gabbia toracica (*pectus excavatum*, scoliosi) o prolasso della mitrale. La sintomatologia insorge subdolamente con tosse produttiva e astenia; meno frequentemente si riscontrano malessere generale, dispnea, febbre ed emottisi, mentre un calo ponderale può manifestarsi negli stadi avanzati della malattia. La valutazione clinica del paziente non è agevole dal momento che la colonizzazione da parte di MNT spesso si associa alle patologie predisponenti suddette. Inoltre, l'aspetto radiografico delle lesioni polmonari non consente una facile differenziazione dalla tubercolosi, anche se le cavitazioni a parete sottile, la scarsità dell'infiltrato pericavitario e uno spiccato interessamento della pleura omolaterale si possono considerare peculiari della pneumopatia da MNT.

La diffusione broncogenica, tipica della tubercolosi, si riscontra molto raramente e talvolta la malattia esita in un addensamento polmonare o in un nodulo solitario senza evidenza di cavitazione. Non è possibile risalire, su base clinica, alla specie micobatterica responsabile della malattia polmonare, per cui rimane indispensabile l'esame colturale con conseguente identificazione del microrganismo isolato. Inoltre l'isolamento di determinate specie di MNT può fornire importanti indicazioni sulla significatività clinica, dal momento che alcune specie (*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium shimoidei*, *Mycobacterium malmøense*) hanno una probabilità più elevata di altre di essere responsabili di patologia. In questo contesto assai complesso i criteri proposti dall'American

Thoracic Society forniscono una guida preziosa per la diagnosi di malattia polmonare da MNT (54) (tab. 1). Essi si fondano su: a) compatibilità del quadro clinico; b) isolamenti multipli, in carica elevata, della specie di MNT in causa. Un isolamento singolo viene considerato significativo solo se ottenuto direttamente dal tessuto polmonare. Nel tentativo di standardizzare le metodiche di isolamento colturale, il lavaggio bronco-alveolare o l'aspirato bronchiale vengono oggi preferiti all'escreato come campione di riferimento per la coltura (54). Delle oltre 140 specie di MNT attualmente conosciute, la grande maggioranza può causare malattia polmonare. Saranno qui descritte quelle specie per le quali è disponibile in letteratura una sufficiente mole di evidenze scientifiche. Le principali caratteristiche clinico-epidemiologiche delle infezioni polmonari da MNT sono illustrate nella tabella 3.

Tab. 1 - CRITERI DIAGNOSTICI PER LE INFEZIONI POLMONARI DA MICOBATTERI NON TUBERCOLARI (MNT) (54).

<p>Criteri clinici (entrambi necessari)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sintomatologia polmonare, pneumopatia di tipo cavitario o non cavitario (lesioni nodulari o bronchiectasie multifocali) 2. Esclusione di ogni altra possibile causa infettiva
<p>Criteri microbiologici (solo uno necessario)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coltura positiva da almeno due differenti campioni di escreato 2. Coltura positiva da almeno un campione di broncoaspirato o di lavaggio bronco-alveolare 3. Una biopsia transbronchiale o polmonare che evidenzi caratteristiche istopatologiche patognomiche (granulomi e/o bacilli alcol-acido-resistenti) e che risulti positiva alla coltura per MNT, oppure una biopsia transbronchiale o polmonare che evidenzi caratteristiche istopatologiche patognomiche associata a uno o più escreti o lavaggi bronco-alveolari positivi in coltura per MNT

4.2.1. MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX

Il *Mycobacterium avium* complex (MAC) comprende micobatteri a lenta crescita, non pigmentati, le cui caratteristiche fenotipiche, evidenziabili con test biochimici, non consentono una precisa differenziazione a livello di specie. Al momento attuale, all'interno del complesso trovano posto dieci specie (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. vulneris*, *M. bouchederhonnense*, *M. marseillense*, *M. yongonense*, *M. timonense*) e un numero di microrganismi non classificati conosciuti come *M. avium-intracellulare* "cluster X" o MAIX (7, 9, 116, 128, 132, 135).

Si ritiene comunemente che *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* siano le uniche specie del MAC isolate frequentemente e che tutte le altre siano estremamente rare; si tratta di una convinzione infondata, conseguenza dell'insufficiente specificità dei sistemi di identificazione oggi più largamente diffusi (DNA-probe; v. cap. 8) che attribuiscono alla specie *Mycobacterium intracellulare* la stragrande maggioranza delle specie del MAC diverse da *Mycobacterium avium* (124).

Cariche elevate di MAC vengono isolate dall'acqua e dal suolo; i micobatteri appartenenti al MAC, inoltre, sono moderatamente resistenti al cloro e capaci di crescere in presenza di una concentrazione del 2% di cloruro di sodio (70). Non stupisce perciò che questi microrganismi colonizzino i sistemi di distribuzione dell'acqua e siano anche reperiti nell'acqua potabile, sia in ambiente domestico che ospedaliero. L'aerosolizzazione da queste fonti sembra la causa più probabile di infezione, mentre non vi è evidenza di trasmissione interumana diretta.

Le infezioni polmonari da MAC (tab. 2) si presentano nel paziente immunocompetente con due distinti pattern clinici (2, 47, 101, 106). Il paziente “tipo” è un maschio bianco anziano solitamente affetto da una pneumopatia cronica riconducibile alle condizioni predisponenti illustrate in precedenza. L’esordio clinico può essere indistinguibile da quello della tubercolosi polmonare: tosse produttiva, astenia, calo ponderale, febbricola, sudorazioni notturne e, meno frequentemente, emottisi. La localizzazione più comune è a livello del lobo superiore, ove spesso coesistono anche fenomeni di ispessimento pleurico. Il quadro radiologico è generalmente caratterizzato da lesioni cavitarie (solitamente a pareti sottili), ma si possono evidenziare anche infiltrati e noduli solitari (50, 81, 145) (fig. 4.1). Una seconda forma clinica colpisce quasi esclusivamente donne anziane affette da anomalie strutturali della gabbia toracica, ma indenni da pneumopatie croniche predisponenti (77, 100). Questa condizione prende il nome di sindrome di Lady Windermere (38, 102) ed è caratterizzata da tosse produttiva con escreato purulento e possibile emottisi. Si ha febbre solo in caso di compromissione diffusa del polmone che si associa a positività microscopica dell’escreato. Il quadro radiografico mostra piccoli infiltrati nodulari e bronchiectasie cilindriche localizzate soprattutto al lobo medio e alla lingua. I ceppi di MAC isolati da pazienti con sindrome di Lady Windermere hanno una eterogeneità genetica di gran lunga superiore rispetto a quelli isolati dai pazienti “tipici”.

Tab. 2 - SINOSI DEI QUADRI CLINICI ASSOCIATI ALLA PNEUMOPATIA DA *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX.

Caratteristiche	Forma tipica	Sindrome di Lady Windermere	Hot tub lung
Età	60-80 anni	55-75 anni	Età media: 36 anni
Sesso	Predominanza maschile	Predominanza femminile	Leggera predominanza femminile
Condizioni predisponenti	Precedente patologia polmonare	Anomalie strutturali della gabbia toracica	No
Esordio clinico	Insidioso, può essere confuso con un peggioramento delle condizioni di co-morbilità polmonare. Le forme severe si accompagnano a positività dell’esame microscopico	Cronico, decorso evolutivo nello spazio di mesi o anni	Subacuto, nello spazio di settimane o mesi
Aspetto radiografico	Pneumopatia bilaterale solitamente cavitaria o fibro-cavitaria	Infiltrati nodulari con bronchiectasie cilindriche	Infiltrati interstiziali o nodulari diffusi
Decorso e prognosi	Scarsa risposta alla terapia con frequenti recidive. Risultati più consistenti in seguito all’associazione del trattamento della patologia di base a “igiene bronchiale”	Andamento cronico con frequenti recidive: risultati apprezzabili con antibiotici e “igiene bronchiale”	Completa guarigione dopo rimozione della fonte sensibilizzante. Terapia con steroidi

Ciò viene interpretato come una predisposizione subclinica, nella sindrome di Lady Windermere, alle reinfezioni esogene, nonostante la somministrazione di una chemioterapia efficace. I casi dovuti a *Mycobacterium intracellulare*, che ammontano a circa il 70%, sembrano avere una prognosi leggermente più favorevole rispetto a quelli imputabili a *Mycobacterium avium* (91). Le specie appartenenti al MAC possono inoltre essere responsabili di infezioni polmonari in pazienti, quasi esclusivamente adulti, affetti da fibrosi cistica (144) e di una polmonite allergica (*hot tub lung*) che insorge in seguito all'esposizione ad aerosol contaminati da tali microrganismi (76, 86, 89).



Fig. 4.1 - ESCAVAZIONE DEL POLMONE SINISTRO ASSOCIATA A LESIONI PARENCHIMALI CIRCOSTANTI.

Poiché l'ampia diffusione ambientale del MAC può causare colonizzazione del tratto respiratorio, i criteri dell'American Thoracic Society raccomandano che la diagnosi di malattia polmonare venga posta solo in presenza di isolamento ripetuto del microrganismo da pazienti con sintomatologia e quadro clinico compatibili. Un singolo isolamento può essere sufficiente solo se proveniente da lavaggio bronco-alveolare, da aspirato bronchiale o da biopsia transbronchiale. Non esistono test standardizzati di sensibilità ai chemioterapici; fa eccezione la claritromicina, unico antibiotico per il quale sia stata dimostrata una chiara correlazione fra risultato *in vitro* e risposta clinica (30, 108). A causa della scarsa sensibilità del MAC alla maggior parte degli antibiotici antimicobatterici, e in base alla consapevolezza che la malattia polmonare è progressiva e potenzialmente fatale se non adeguatamente trattata, numerose sperimentazioni cliniche sono state condotte nel tentativo di predisporre un protocollo terapeutico adeguato. Le linee guida dell'American Thoracic Society pubblicate nel 2007 (54), raccomandano di trattare la malattia polmonare da MAC con una associazione di un macrolide (claritromicina o azitromicina), una rifamicina (rifampicina o rifabutina) ed etambutolo fino a negativizzazione colturale dell'escreato (testato mensilmente). Si raccomanda anche di somministrare, nelle prime otto settimane di terapia, un farmaco parenterale (streptomicina o amikacina) per favorire una più rapida azione battericida. In alcuni casi particolari, quali estese lesioni polmonari o in presenza di resistenza alla claritromicina, può essere presa in considerazione

l'opportunità di aggiungere un fluorochinolone al protocollo terapeutico. In genere, dopo sei mesi di terapia, più del 90% dei pazienti affetti da sindrome di Lady Windermere raggiungono la negativizzazione dell'escreato, mentre questa percentuale scende al 62-74% per i pazienti con patologia "tipica" associata a una pneumopatia cronica (2, 49). Nel 2002 la British Thoracic Society ha pubblicato i dati di uno studio multicentrico, con un programma di follow-up della durata di tre anni volto alla valutazione comparativa di due protocolli terapeutici adottati per il trattamento dell'infezione polmonare da MAC (15). Entrambi i gruppi di pazienti, trattati per due anni con rifampicina ed etambutolo, con o senza l'aggiunta di isoniazide, hanno mostrato un andamento clinico alquanto deludente con una mortalità a cinque anni del 36% e un alto tasso di ricadute e fallimenti terapeutici (28%). In considerazione del fatto che la rifampicina riduce le concentrazioni sieriche di claritromicina nei pazienti che assumono entrambi i farmaci, la British Thoracic Society non prevede l'uso del macrolide negli attuali protocolli terapeutici (12). Recentemente un protocollo terapeutico a base di claritromicina, etambutolo e clofazimina ha registrato un tasso di negativizzazione dell'esame microscopico dell'escreato e di ricadute simile a quello ottenuto adottando lo schema suggerito dall'American Thoracic Society con i vantaggi di una somministrazione più agevole e di una buona tollerabilità per i pazienti (45). Allo scopo di ridurre gli effetti collaterali della terapia antimicotubercolare, sono stati intrapresi studi per passare da una somministrazione giornaliera a una trisettimanale. Un protocollo di questo genere, a base di rifampicina, etambutolo e claritromicina somministrate a pazienti affetti da infezione polmonare estesa, lesioni cavitari e preesistente pneumopatia cronica, ha tuttavia mostrato una efficacia terapeutica minore rispetto al controllo basato sull'assunzione quotidiana dei farmaci (78). Una terapia a base di agenti mucolitici e broncodilatatori (conosciuta come "igiene bronchiale"), associata a un'adeguata terapia antimicotubercolare, può risultare assai utile specialmente nei pazienti affetti da una preesistente pneumopatia cronica (1).

La chirurgia è un presidio terapeutico importante nella patologia polmonare da MAC, tanto da poter essere risolutiva in alcuni casi di malattia fibro-cavitaria localizzata (90).

4.2.2. *MYCOBACTERIUM KANSASII*

In alcuni Paesi (USA, Repubblica Ceca) *Mycobacterium kansasii* rappresenta, dopo quelle incluse nel MAC, la specie micobatterica più frequentemente responsabile di malattia polmonare nei soggetti immunocompetenti (35). Si tratta di un micobatterio fotocromogeno a lenta crescita, caratterizzato dalla positività a test fenotipici quali la catalasi, la riduzione dei nitrati e l'idrolisi del Tween 80. Lo studio molecolare dei ceppi di *Mycobacterium kansasii* ha mostrato che questa specie è piuttosto eterogenea, potendosi distinguere, al suo interno, almeno cinque diversi sottotipi (117, 130). Fra questi, il sottotipo I è isolato frequentemente da materiali clinici e raramente dall'ambiente. All'opposto, il sottotipo II viene comunemente isolato da fonti ambientali e funge da patogeno opportunisto quasi esclusivamente nei soggetti gravemente immunocompromessi (130). Infine i sottotipi III, IV e V sono raramente isolati dall'uomo, ma sono reperibili in campioni ambientali, in particolare nelle condotte idriche. Con i sistemi commerciali basati sull'ibridazione inversa è possibile ottenere un'identificazione accurata a livello di specie e, in qualche caso, il riconoscimento dei principali sottotipi.

Il serbatoio naturale di *Mycobacterium kansasii* non è stato ancora ben definito, anche se vi sono molti dati che documentano la sua presenza nell'acqua potabile a vari livelli del sistema di distribuzione. *Mycobacterium kansasii* è infatti capace di sopravvivere nell'acqua per più di un anno, mentre

Tab. 3 - VALUTAZIONE COMPARATIVA DELLE PRINCIPALI CARATTERISTICHE CLINICO-EPIDEMIOLOGICHE ASSOCIATE ALLE INFEZIONI POLMONARI DA MICOBATTERI NON TUBERCOLARI.

Specie micobatterica	Potere patogeno	Epidemiologia	Pneumopatia cronica concomitante	Quadro	Caratteristiche clinico-radiologiche	Trattamento	Prognosi (durata)
<i>Mycobacterium avium complex*</i>	+ +	Maschi anziani	Si	Tosse, febbre, calo ponderale, sudorazioni notturne	Lesioni cavitarie del lobo superiore	Claritromicina, etambutolo rifampicina (18 mesi)	Scarsa
		Donne anziane	No	Tosse	Bronchiectasie del lobo medio	Claritromicina, etambutolo, rifampicina (18 mesi)	Discreta
<i>Mycobacterium kansasii</i>	+ + +	Maschi anziani	Si	Tosse, calo ponderale, emottisi	Lesioni cavitarie del lobo superiore	Rifampicina, isoniazide, etambutolo (18 mesi)	Buona
<i>Mycobacterium malmoense</i>	+ + +	Maschi di mezza età	Si	Tosse, febbre, calo ponderale, emottisi	Infiltrati del lobo superiore	Rifampicina, etambutolo (24 mesi)	Discreta
<i>Mycobacterium xenopi</i>	+	Maschi anziani	Si	Tosse, febbre, calo ponderale	Lesioni cavitarie e nodulari del lobo superiore	Claritromicina, etambutolo, rifampicina, streptomina (18 mesi)	Scarsa
<i>Mycobacterium szulgai</i>	+ + +	Maschi anziani	Si	Tosse, febbre, calo ponderale, emottisi	Lesioni cavitarie del lobo superiore	Rifampicina, isoniazide, etambutolo, streptomina (18 mesi)	Buona
<i>Mycobacterium simiae</i>	+	Maschi anziani	Si	Tosse, febbre, calo ponderale, dispnea	Lesioni cavitarie e nodulari del lobo superiore	Claritromicina, moxifloxacina, cotrimossazolo (18 mesi)	Scarsa
<i>Mycobacterium celatum</i>	+	Soggetti anziani	Si	Tosse, febbre, calo ponderale, sudorazioni notturne	Lesioni cavitarie e nodulari del lobo superiore	Non definito	Scarsa
<i>Mycobacterium abscessus</i>	+ +	Donne anziane	Si	Tosse, febbre, calo ponderale emottisi	Lesioni interstiziali e nodulari diffuse	Claritromicina, amikacina, cefoxitina (1 mese) Resezione chirurgica	Scarsa

*Vedi anche tabella 2.

non possiede una simile resistenza nel suolo, da dove viene raramente isolato. Queste evidenze, associate al fatto che la trasmissione interumana non è dimostrata, hanno portato a ipotizzare che l'infezione polmonare da *Mycobacterium kansasii* avvenga per aerosolizzazione da fonti ambientali.

I fattori di rischio per la malattia polmonare da *Mycobacterium kansasii* includono una vasta gamma di patologie respiratorie, le neoplasie (72) e l'alcolismo. Il quadro clinico può variare da una forma lieve, senza segni di evoluzione, a una malattia cronica ingravescente non dissimile dalla tubercolosi. Generalmente sono colpiti pazienti maschi, di razza bianca, anziani o di mezza età, solitamente residenti in aree urbane e che riferiscono all'anamnesi una storia di pregressa patologia polmonare. Segni e sintomi sono del tutto aspecifici e comprendono tosse, calo ponderale, astenia, malessere e, più raramente, febbre e sudorazioni notturne. L'emottisi compare più frequentemente che in caso di tubercolosi (5, 43) (tab. 3).

La più frequente lesione riscontrabile radiologicamente è di tipo cavitario, anche se si possono osservare lesioni fibro-nodulari e bronchiectasie simili a quelle descritte nella patologia da MAC (46). Il paziente "tipo" presenta una lesione polmonare unilaterale, a carico del lobo polmonare superiore destro, caratterizzata da piccole cavitazioni multiple a parete sottile. Il coinvolgimento dei lobi inferiori e della pleura è così raro da poter essere considerato un parametro di esclusione (43).

Fra i materiali respiratori, il broncoaspirato è da preferirsi all'espettorato, spontaneo o indotto, potendo risultare positivo alla coltura in più del 75% dei casi e alla microscopia in circa il 30% dei casi (83). Al microscopio è possibile, soprattutto dopo coltura in terreno liquido, osservare micobatteri che presentano bande trasversali, considerate caratteristiche di *Mycobacterium kansasii*.

In vitro, *Mycobacterium kansasii* è abbastanza sensibile ai farmaci antitubercolari di prima scelta ad esclusione della pirazinamide. L'unico test di sensibilità validato riguarda la rifampicina e dovrebbe essere eseguito esclusivamente sugli isolati clinicamente significativi provenienti da pazienti già trattati, senza successo, con questo farmaco (30). Seppur in assenza di una chiara correlazione fra risultati *in vitro* ed efficacia della terapia, i test di sensibilità possono essere eseguiti nei confronti di claritromicina e fluorochinoloni nel caso di ceppi con documentata resistenza alla rifampicina (3).

Le indicazioni terapeutiche attuali per il trattamento della pneumopatia da *Mycobacterium kansasii* prevedono la somministrazione giornaliera di un'associazione di rifampicina, isoniazide ed etambutolo per una durata complessiva di 18 mesi e comunque per almeno 12 mesi dopo la negativizzazione dell'esame colturale. La claritromicina può essere utilizzata in caso di rifampicina-resistenza o di intolleranza ai chemioterapici di prima scelta. La claritromicina, insieme a rifampicina ed etambutolo, si è dimostrata efficace anche adottando una somministrazione a giorni alterni (55). L'adozione del trattamento *short course* per la pneumopatia da *Mycobacterium kansasii* è ancora *sub iudice*; un trial completato in 154 pazienti, a base di rifampicina ed etambutolo somministrati giornalmente per nove mesi ha mostrato un tasso di ricadute del 10% e un'elevata mortalità (23%); quest'ultima era però, in molti casi, imputabile a co-morbilità non direttamente correlate all'infezione da *Mycobacterium kansasii* (13).

4.2.3. MYCOBACTERIUM MALMOENSE

Mycobacterium malmoense è stato descritto per la prima volta come specie patogena per l'uomo nel 1977 da Schröder e Juhlin (111). Per molti anni è stato isolato esclusivamente in un ristretto gruppo di Nazioni del Nord Europa, principalmente Svezia, Finlandia e Gran Bretagna, e solo dall'inizio degli anni '90 la sua presenza è stata registrata anche in altri Paesi, per lo più industrializzati.

Dato che questo microrganismo presenta esigenze nutrizionali particolari che ne condizionano l'isolamento, l'aumentato numero di segnalazioni può essere conseguenza dell'evoluzione dei sistemi di coltura e di identificazione in uso presso i laboratori.

Mycobacterium malmoense è un microrganismo non cromogeno, a lenta crescita, il cui isolamento può risultare problematico. La coltura va obbligatoriamente eseguita su terreni liquidi che garantiscono una maggior sensibilità e tempi di rilevamento più rapidi, mentre l'utilizzo dei soli terreni solidi comporta una notevole riduzione della percentuale di isolamenti (21, 66). Una corretta identificazione non può prescindere dall'utilizzo di test quali la *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) o i test di biologia molecolare (ibridazione inversa o sequenziamento) (59).

Nei soggetti immunocompetenti, la maggior parte delle infezioni è a carico del polmone, ma non mancano le linfadeniti pediatriche, che costituiscono la forma più comune di localizzazione extrapolmonare (63); la prevalenza delle due forme cliniche configura un rapporto di circa 5:1 (21). La malattia polmonare è più facilmente riscontrabile in soggetti di mezza età affetti da precedenti patologie respiratorie; anche il fumo e l'alcolismo rappresentano fattori di rischio significativi.

Analogamente a quanto detto per gli altri MNT, l'ambiente (suolo, acqua) viene considerato l'unico serbatoio per l'infezione polmonare. Classicamente, i pazienti si presentano all'osservazione clinica con tosse persistente, calo ponderale, emottisi e un quadro radiologico che evidenzia infiltrati di tipo cavitario o nodulare a carico del lobo polmonare superiore (tab. 3). La pneumopatia da *Mycobacterium malmoense* è solitamente associata ad esame microscopico positivo. Sono stati descritti numerosi casi di malattia nei quali l'eziologia da *Mycobacterium malmoense* è stata riconosciuta anche in presenza di un solo isolamento colturale; il fatto che *Mycobacterium malmoense* sia quasi invariabilmente associato a malattia depone per una maggior virulenza rispetto ad altre specie (37, 41).

In vitro, *Mycobacterium malmoense* è resistente a streptomicina, isoniazide, rifampicina, ciprofloxacina e pirazinamide (67). I test di sensibilità *in vitro* non sono indicati, dal momento che i dati della letteratura sembrano negare ogni correlazione con la risposta clinica alla terapia (62). Studi prospettici a lungo termine hanno dimostrato che l'associazione di rifampicina ed etambutolo, sebbene non sia in grado di ridurre significativamente né la mortalità a cinque anni né la percentuale dei fallimenti e delle recidive, è più efficace di altri protocolli basati su un maggior numero di farmaci. Tale schema terapeutico, in cui l'etambutolo viene considerato il farmaco chiave, va somministrato per 24 mesi anche in presenza di negativizzazione precoce dell'esame colturale (16). Risultati interessanti sono stati ottenuti anche utilizzando schemi terapeutici a base di macrolidi; queste evidenze non sono supportate tuttavia da adeguate basi metodologiche in quanto ottenute al di fuori di trial clinici randomizzati (41).

La resezione chirurgica può essere indicata in caso di localizzazioni polmonari circoscritte per le quali la chemioterapia antimicobatterica si sia dimostrata inefficace.

4.2.4. MYCOBACTERIUM XENOPI

Mycobacterium xenopi è stato descritto per la prima volta nel 1959 in seguito all'isolamento da una raccolta purulenta di un rospo (*Xenopus laevis*) allevato in laboratorio, ma si è dovuto attendere fino al 1965 prima che fosse segnalato come specie patogena per l'uomo.

Esiste una considerevole mole di dati epidemiologici che localizzano nelle condotte idriche il principale reservoir di *Mycobacterium xenopi* (44). Sfruttando la capacità di crescita a 45 °C, tale spe-

cie fa dei sistemi termoidraulici la sua più importante nicchia ecologica. Poiché *Mycobacterium xenopi* è stato ripetutamente isolato dagli spruzzatori delle docce, è verosimile che l'infezione polmonare possa essere contratta per aerosolizzazione di acqua contaminata. Questa ipotesi è sicuramente plausibile, anche se per lo sviluppo della malattia è indispensabile la concomitanza di una ridotta funzionalità (locale o generalizzata) del sistema immunitario del paziente.

Il paziente con pneumopatia da *Mycobacterium xenopi* è solitamente un individuo anziano affetto da tosse persistente, della durata di parecchie settimane, febbricola e calo ponderale (tab. 3).

L'emottisi è un evento infrequente in una malattia che ha un decorso lentamente progressivo. Il quadro radiografico più comune mostra cavità a pareti sottili localizzate nel lobo polmonare superiore, associate a lesioni fibro-nodulari del diametro di 1-3 cm (32, 74, 113). *Mycobacterium xenopi* è frequentemente isolato da materiali clinici in assenza di malattia; nei pazienti in cui, in base ai criteri diagnostici dell'American Thoracic Society, esiste significatività clinica, l'esame microscopico e colturale sono spesso positivi. La colonizzazione da *Mycobacterium xenopi* si riscontra spesso in soggetti con tubercolosi attiva o pregressa (39, 74).

Grazie alla caratteristica crescita a 45 °C e all'aspetto *nest-like* delle microcolonie osservate a piccolo ingrandimento su terreno agarizzato (fig. 4.2), l'identificazione presuntiva di *Mycobacterium xenopi* non è difficile. L'identificazione può essere confermata tramite HPLC degli acidi micolici o utilizzando tecniche di biologia molecolare (ibridazione inversa) (27, 59). Qualche difficoltà si può incontrare per l'isolamento, dal momento che la crescita di *Mycobacterium xenopi* alla temperatura di 37 °C è molto lenta, tanto che in terreno liquido può rendersi necessario un prolungamento dell'incubazione oltre le sei settimane usualmente programmate.

Non esistono al momento protocolli standardizzati per il trattamento della pneumopatia da *Mycobacterium xenopi* e, sebbene la sensibilità *in vitro* sia discreta (relativamente a streptomicina, rifampicina, claritromicina, ciprofloxacina e altri fluorochinoloni [129]), la correlazione fra quest'ultima e la risposta clinica alla terapia è inconsistente (62, 129). È stato suggerito un protocollo terapeutico della durata di 18-24 mesi a base di un macrolide, rifampicina o rifabutina, ed etambutolo con l'eventuale aggiunta di streptomicina (73, 110). In un trial condotto dalla British Thoracic

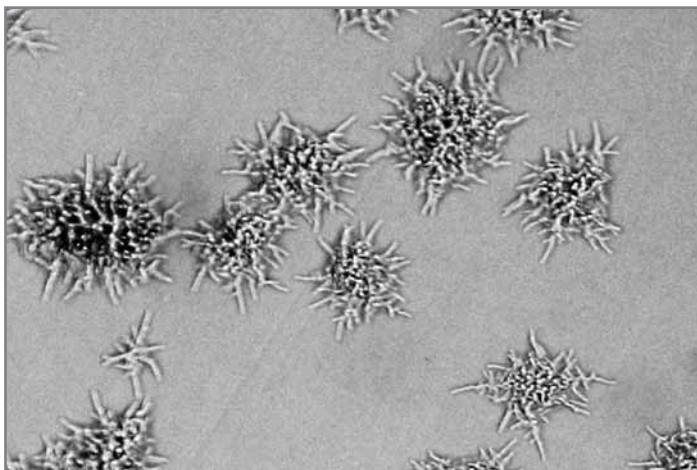


Fig. 4.2 - MICROCOLONIE
NEST-LIKE DI *MYCOBACTERIUM*
XENOPI.

Society, la pneumopatia da *Mycobacterium xenopi* ha registrato tassi di mortalità più elevati di quella da *Mycobacterium avium* complex e da *Mycobacterium malmoense*. I risultati del trial dimostrano che un protocollo terapeutico a base di rifampicina ed etambutolo somministrato per 24 mesi è più soddisfacente di uno a base di rifampicina, etambutolo e isoniazide somministrati per lo stesso periodo di tempo (14).

La resezione chirurgica viene riservata ai pazienti che non hanno risposto alla chemioterapia antimicobatterica o che presentano recidive dopo un'iniziale risposta.

4.2.5. MYCOBACTERIUM SZULGAI

Mycobacterium szulgai è stato descritto per la prima volta come specie a sé stante da Marks nel 1972. Si tratta di una specie isolata raramente dall'uomo, ma associata a malattia nella quasi totalità dei casi. Un isolamento di *Mycobacterium szulgai* è praticamente sempre significativo indipendentemente dal rispetto dei criteri diagnostici dell'American Thoracic Society.

Le infezioni più comuni sono quelle polmonari, seguite con frequenza assai minore dalle infezioni dei tessuti molli. L'epidemiologia di *Mycobacterium szulgai* (fattori di rischio e fonte di infezione) non differisce da quella descritta per gli altri MNT a crescita lenta.

La malattia polmonare ha un decorso indolente e colpisce soggetti anziani o di mezza età affetti da precedenti patologie polmonari (tab. 3). Spesso coesiste un'anamnesi positiva per tabagismo di lunga data e/o alcolismo. I pazienti riferiscono tosse persistente, astenia, febbre, calo ponderale ed emottisi. Radiologicamente, si evidenziano infiltrati apicali simili a quelli della tubercolosi che mostrano al loro interno, in circa la metà dei casi, cavitazioni a pareti sottili (44). La microscopia è spesso positiva (34). A 37 °C questa specie è scotocromogena, con pigmentazione di colore giallo-arancio, mentre a 25 °C può risultare fotocromogena; esistono in commercio sonde molecolari (ibridazione inversa) che ne permettono l'identificazione. *In vitro*, *Mycobacterium szulgai* risulta sensibile alla maggior parte dei farmaci antimicobatterici (52).

Per la terapia dell'infezione polmonare non esistono protocolli standardizzati. La maggior parte dei casi è stata trattata con un'associazione di rifampicina, etambutolo e isoniazide con o senza streptomina per almeno 18 mesi, o per 12 mesi a partire dalla negativizzazione colturale dell'escreato. Solitamente la risposta alla terapia è pronta e si accompagna a negativizzazione delle colture entro un periodo che oscilla fra le 3 settimane e i 4 mesi dall'inizio della somministrazione.

4.2.6. MYCOBACTERIUM SIMIAE COMPLEX

Mycobacterium simiae è stato descritto per la prima volta da Karasseva nel 1965 e deve il suo nome al fatto di essere stato isolato da una scimmia, *Macacus rhesus*. Solamente nel 1971 questa specie è stata riconosciuta in grado di provocare infezione polmonare nell'uomo. I dati della letteratura segnalano che *Mycobacterium simiae* viene isolato con maggior frequenza in alcuni Paesi e in particolare in Israele, Cuba e nel sud degli Stati Uniti, soprattutto in Texas e Arizona (44, 131).

I recenti progressi della tassonomia del genere *Mycobacterium* hanno evidenziato l'esistenza di numerose specie strettamente correlate geneticamente a *Mycobacterium simiae*. Tali specie, al momento 17, sono accomunate dalla presenza, all'interno dell'elica 18 dell'rRNA 16S, di una delezione di 12 pb che le differenzia da tutti gli altri micobatteri a crescita lenta. Un'indagine filogenetica più

approfondita ha evidenziato all'interno del gruppo, per il quale è stata proposta la denominazione "Mycobacterium simiae complex" di alcuni sottogruppi distinti, a livello fenotipico, per il pattern di acidi micolici e per la sensibilità ai farmaci (123). Il sottogruppo di cui fa parte *Mycobacterium simiae* include varie specie clinicamente rilevanti quali *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium triplex*, *Mycobacterium florentinum* e *Mycobacterium sherrisii*. Si tratta di specie identificabili soltanto ricorrendo al sequenziamento genico (107, 126), dal momento che i sistemi commerciali basati sull'ibridazione inversa o non le includono o presentano reattività crociate, mentre l'analisi degli acidi micolici mediante HPLC non è in grado di discriminarle. I dati della letteratura relativi a *Mycobacterium simiae* devono verosimilmente essere estesi a tutte le specie suddette. Sebbene questi microrganismi siano per lo più responsabili di colonizzazioni, temporanee o permanenti, in soggetti affetti da pneumopatie croniche possono non di rado causare malattia (142). La maggior parte dei pazienti sono anziani che presentano esiti di tubercolosi o altre anomalie a carico dell'apparato respiratorio; essi si presentano all'osservazione clinica riferendo tosse produttiva, dispnea e, meno frequentemente, febbre, sudorazioni notturne e calo ponderale (tab. 3). Al quadro radiografico, si osservano principalmente lesioni nodulari o cavitare a carico dei lobi polmonari superiori (8, 105).

La terapia dell'infezione polmonare da *Mycobacterium simiae* e specie correlate è alquanto problematica. Gli isolati clinici sono resistenti *in vitro* a tutti i farmaci antimicobatterici e la risposta alla terapia è imprevedibile (131). Per i pazienti con infezione polmonare ingravescente è suggerito uno schema terapeutico a base di claritromicina, moxifloxacina e cotrimossazolo (54).

4.2.7. MYCOBACTERIUM CELATUM

Mycobacterium celatum è stato inizialmente considerato una variante di *Mycobacterium xenopi* (*Mycobacterium xenopi-like organism*) e solo successivamente è stato riconosciuto come specie autonoma da Butler et al. nel 1993. Si distinguono tre sottotipi di *Mycobacterium celatum* in base alla sequenza del gene che codifica per l'rDNA 16S (120). I sottotipi 1 e 3 cross-reagiscono con una sonda del commercio (AccuProbe, Gen-Probe) per l'identificazione del *Mycobacterium tuberculosis* complex e con il sistema di amplificazione AMPLICOR (Roche), dando così luogo a risultati errati (22). La differenziazione di *Mycobacterium celatum* da altre specie, quali *Mycobacterium branderi*, *Mycobacterium xenopi* e MAC, non è agevole ed è indispensabile ricorrere a test quali l'ibridazione inversa (che tuttavia non riconosce il tipo 2) e il sequenziamento genico.

Anche se non sono stati effettuati studi atti a definire le possibili fonti di infezione, si pensa che queste non differiscano da quelle descritte per gli altri MNT (suolo, acqua). Al momento attuale, solo pochi casi di infezione polmonare da *Mycobacterium celatum* sono stati descritti in pazienti immunocompetenti (23, 29, 99, 119). Si tratta di soggetti anziani, alcuni dei quali presentano una o più delle condizioni predisponenti già descritte. La sintomatologia è costituita da tosse persistente, febbricola, sudorazioni notturne, calo ponderale e si accompagna a un quadro radiografico in cui predominano infiltrati con lesioni cavitare a carico dei lobi polmonari superiori e lesioni nodulari (tab. 3).

I test *in vitro* eseguiti sugli isolati clinici di *Mycobacterium celatum* mostrano sensibilità a claritromicina, ciprofloxacina, etambutolo e resistenza a isoniazide, rifampicina, e pirazinamide (98). Non è ancora chiaro se le differenze di sensibilità riscontrate nei ceppi statunitensi rispetto a quelli europei siano da imputare all'uso di metodi non standardizzati (18) o riflettano invece reali differenze fra cloni batterici (98).

In generale, la prognosi dei pazienti con pneumopatia da *Mycobacterium celatum* non è buona. Due dei sei pazienti descritti in letteratura sono deceduti a causa dell'infezione, un terzo è migliorato pur persistendo la positività microscopica dell'escreato dopo un anno di terapia, mentre per un quarto è stata necessaria la resezione chirurgica. Solamente un paziente risulta guarito dopo 18 mesi di terapia; generalmente il miglioramento clinico, inteso come risoluzione della sintomatologia e riduzione radiografica delle lesioni, è stato ottenuto soltanto in seguito all'aggiunta della claritromicina al protocollo terapeutico.

Negli ultimi anni sono stati segnalati casi di patologie da *Mycobacterium celatum* in vari animali; in alcuni report, riguardanti animali da compagnia, non viene esclusa la possibilità di trasmissione all'uomo (85).

4.2.8. MICOBATTERI A CRESCITA RAPIDA

Le specie micobatteriche che, dopo appropriata diluizione dell'inoculo, producono una crescita visibile entro sette giorni dalla semina in terreno solido, vengono definite "a rapida crescita". La pneumopatia da micobatteri a crescita rapida è un evento inconsueto ma clinicamente rilevante, causato per circa l'80% dei casi da *Mycobacterium abscessus* e per il restante 20% da *Mycobacterium fortuitum* e specie correlate (56). L'identificazione corretta di tali micobatteri è resa problematica dalla notevole espansione che ha caratterizzato negli ultimi anni la tassonomia dei micobatteri a crescita rapida; le sonde molecolari danno spesso reazioni crociate con specie affini, e solo il sequenziamento, preferibilmente della regione variabile del gene *rpoB*, è in grado di dare risultati soddisfacenti.

A causa della diffusa presenza dei micobatteri a crescita rapida nell'ambiente e nelle condotte idriche, il contatto con la fonte di infezione è molto frequente ma, affinché la malattia possa insorgere, è necessaria la concomitante presenza di una o più condizioni favorevoli quali acalasia, neoplasie, fibrosi cistica e/o precedenti infezioni da micobatteri (56, 71). In generale, il paziente "tipo" è una donna di circa 60 anni, non fumatrice, che giunge all'osservazione per tosse produttiva, febbricola, emottisi e, più raramente, calo ponderale. All'anamnesi risulta che la malattia è in atto da tempo, mediamente da un paio di anni, ed è caratterizzata da andamento gradualmente progressivo. Il quadro radiografico evidenzia un pattern interstiziale e/o la presenza di lesioni nodulari, mentre le lesioni escavate sono infrequenti e compaiono per lo più in fase avanzata. La sede è tipicamente multilobare, caratterizzata, in oltre il 70% dei casi, da localizzazioni bilaterali che spesso interessano entrambi i lobi superiori. Nel caso di precedenti pneumopatie da micobatteri, l'infezione si instaura nella sede dell'evento morboso pregresso (tab. 3). Il decorso della pneumopatia da micobatteri a crescita rapida è generalmente indolente; la mortalità non supera il 15% e interessa i casi con andamento ingravescente (56). La diagnosi microbiologica soddisfa agevolmente i criteri dell'American Thoracic Society dal momento che la maggior parte dei pazienti risulta ripetutamente positiva all'esame microscopico e colturale.

L'identificazione riveste importanza clinica notevole dato che le varie specie differiscono per pattern di sensibilità e virulenza. Tutte le specie coinvolte sono resistenti ai farmaci antitubercolari, esistono però pattern specifici per alcune di esse: *Mycobacterium fortuitum* è sensibile ad amikacina, cefoxitina, imipenem, ciprofloxacina e claritromicina; *Mycobacterium chelonae* è sensibile a tobramicina e claritromicina, parzialmente sensibile ad amikacina e imipenem, e resistente a cefoxitina e ciprofloxacina; *Mycobacterium abscessus* è sensibile ad amikacina e claritromicina, parzialmente sensibile a cefoxitina e imipenem e resistente a ciprofloxacina (18, 150).

Mycobacterium abscessus, la specie più frequentemente responsabile di infezione (71) è associata a mortalità significativamente più alta rispetto a *Mycobacterium fortuitum* (56). Un miglioramento clinico e radiologico di tali infezioni richiede normalmente una terapia di associazione basata su almeno due farmaci per prevenire l'insorgenza di resistenze. Il trattamento della pneumopatia da *Mycobacterium abscessus* è ancora largamente insoddisfacente dal momento che, anche se 2-4 settimane di trattamento con amikacina, cefoxitina e claritromicina producono un miglioramento clinico, al termine della somministrazione degli antibiotici si verificano sistematiche ricadute (54). Anche se l'esperienza al riguardo è limitata e le concentrazioni minime inibenti risultano relativamente alte, l'impiego del linezolid sembra offrire una nuova opportunità terapeutica (18, 46).

Nel caso di malattia polmonare localizzata, la resezione chirurgica si è dimostrata l'unico presidio terapeutico in grado di portare alla negativizzazione dell'escreato a lungo termine (112).

Molto più limitato è il numero delle infezioni polmonari causate da *Mycobacterium fortuitum* e dalle specie ad esso correlate *Mycobacterium mageritense* e *Mycobacterium peregrinum*; in questi casi un trattamento a base di fluorochinoloni, sulfonamidi, doxiciclina, amikacina e cefoxitina è solitamente efficace, specialmente se prescritto in base alle indicazioni del test di sensibilità (30).

4.3. INFEZIONI DEI LINFONODI SUPERFICIALI

Le linfadeniti da MNT sono tipicamente patologie infantili e interessano quasi sempre i linfonodi cervicali superiori. L'infezione rimane di solito unilaterale e localizzata senza coinvolgimento dei linfonodi toracici. La presentazione clinica è quanto mai varia. La tumefazione linfonodale, che compare nel giro di pochi giorni dall'infezione, può manifestarsi in maniera appena percettibile, ma può arrivare ad essere deturpante poiché i linfonodi aumentano di volume e tendono, per fenomeni di periadenite, a fondersi in pacchetti. La cute soprastante, inizialmente non coinvolta, aderisce in fasi più avanzate al processo flogistico, divenendo eritematosa; il dolore è minimo e spesso è assente. Normalmente non si manifestano alterazioni dei principali parametri ematici. L'evoluzione della lesione può essere caratterizzata da colliquazione della massa linfonodale con formazione di fistola, il cui drenaggio può prolungarsi nel tempo.

Il trattamento antibiotico è generalmente inefficace e la guarigione si ottiene solitamente con l'asportazione totale dei linfonodi coinvolti. Una precoce escissione chirurgica, oltre a consentire l'isolamento dell'agente responsabile, previene la progressione della lesione e il relativo danno estetico e permette di rimuovere tutto il tessuto infetto impedendo la propagazione dell'infezione per contiguità. In circa il 20% dei casi, solitamente in relazione a escissioni tardive, si hanno recidive che possono richiedere un secondo intervento chirurgico. Quando è presente fistolizzazione, oppure quando le terminazioni del nervo facciale sono in contiguità con il tessuto infetto, l'intervento chirurgico può riservare un certo margine di rischio. In questi casi, ai fini di ridurre l'ampiezza dell'area coinvolta e di limitare l'infiammazione, può essere utile il trattamento antibiotico da iniziare dopo aver eseguito un agoaspirato diagnostico. Non esiste al riguardo un protocollo standardizzato (farmaci e durata del trattamento chemioterapico non sono stati definiti), tuttavia una terapia a base di claritromicina in associazione con altri farmaci risulta talvolta clinicamente utile. Come secondo farmaco viene generalmente usata una rifamicina (rifampicina o rifabutina) oppure l'etambutolo; in alcuni casi sono stati utilizzati tre farmaci. Il ricorso all'antibioticoterapia va preso in considerazio-

ne anche nel caso in cui non sia stato possibile asportare chirurgicamente tutto il tessuto infetto, solitamente a causa del coinvolgimento di strutture anatomiche viciniori, quali le terminazioni del nervo facciale, o in presenza di localizzazioni extranodali (53, 61, 84, 118).

L'ipotesi patogenetica più accreditata individua nella cavità orale e nella faringe la porta di ingresso dei micobatteri e nei linfatici drenanti il tramite per raggiungere i linfonodi. Il fatto che la patologia si manifesti quasi esclusivamente in età infantile è certamente da porre in relazione alla consuetudine dei bambini di portare le mani, spesso contaminate, alla bocca. In alcuni casi l'infezione si manifesta in concomitanza con l'eruzione dentaria. Inoltre, la maggior frequenza di linfadeniti durante la stagione fredda sembra sostenere il ruolo favorente delle faringiti acute nella patogenesi dell'infezione. I casi di infezioni riguardanti altre sedi linfonodali (inguinale, ascellare, femorale, epitrocleare) o soggetti adulti sono estremamente rari.

Il quadro delle specie responsabili delle linfadeniti infantili ha subito notevoli cambiamenti negli ultimi anni (148). *Mycobacterium scrofulaceum*, considerato tradizionalmente agente eziologico ("capro espiatorio") di questo tipo di infezioni, viene isolato oggi piuttosto raramente, mentre è nettamente più frequente il riscontro delle specie appartenenti al MAC, *Mycobacterium avium* in particolare.

Ancora bassa rimane in Italia la frequenza di specie, pur ripetutamente segnalate in letteratura in altri Paesi, quali *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium kansasii* (147). Per contro, sempre più spesso si isolano micobatteri considerati fino a qualche tempo fa poco frequenti, nonché specie nuove.

Mycobacterium malmoense è una specie particolarmente diffusa nei Paesi scandinavi e in Gran Bretagna, dove le linfadeniti infantili dovute a tale organismo non sono affatto rare (142). Anche in Italia, negli ultimi anni, sono stati riportati vari isolamenti di *Mycobacterium malmoense* da linfonodi cervicali di bambini. È probabile che l'incidenza sia sottostimata, dato che tale micobatterio è caratterizzato da crescita lentissima, richiede temperature di incubazione (32 °C) più basse di quelle usate normalmente e le colonie, minutissime, possono non risultare visibili sui terreni all'uovo (125).

Un altro micobatterio dalla crescita problematica, *Mycobacterium haemophilum*, è stato isolato più volte da linfonodi cervicali di bambini immunocompetenti (6, 20). Questa specie, richiedendo per la crescita l'incubazione a 30-32 °C e terreni addizionati con emina o con citrato ferrico di ammonio, sfugge in molti casi alla ricerca colturale.

Una segnalazione a parte meritano i micobatteri "nuovi", cioè quelli descritti a partire dagli anni '90 in seguito all'impiego della biologia molecolare come tecnica identificativa. Non pochi di essi sono stati isolati per la prima volta proprio da linfonodi di bambini. Le specie più frequentemente coinvolte, anche in Italia, includono *Mycobacterium bohemicum* (120, 121), *Mycobacterium interjectum* (120, 121) e *Mycobacterium lentiflavum* (120, 121). Fra le specie riportate più raramente vale la pena di ricordare *Mycobacterium celatum* (120, 121), *Mycobacterium genavense* (120, 121) e *Mycobacterium heidelbergense* (120, 121).

Le linfadeniti causate da micobatteri non tubercolari sono, per contro, estremamente rare nell'adulto. L'unico caso di interessamento di linfonodi cervicali descritto riguarda una donna quarantacinquenne sottoposta in precedenza a intervento chirurgico parodontale; in tale circostanza è stato isolato *Mycobacterium lentiflavum* (97). *Mycobacterium elephantis* è stato riscontrato in un caso di linfadenite ascellare (120, 121).

Una forma particolare di linfadenite micobatterica può manifestarsi nei soggetti affetti da AIDS che sviluppano, durante la fase di ricostituzione del sistema immunitario che fa seguito all'inizio della terapia antiretrovirale, la sindrome infiammatoria da immunoricostituzione (IRIS). La linfadenite è costituita in tali casi da una reazione paradossa del sistema linfatico nei confronti di infezioni subcliniche precedentemente non diagnosticate, e i MNT sono fra gli agenti infettivi più frequentemente coinvolti. La terapia prevede l'affiancamento di un cortisonico ai farmaci antimicobatterici e la prognosi a lungo termine è favorevole (96).

4.4. INFEZIONI CUTANEE E DEI TESSUTI MOLLI

Il contatto con acque contaminate o pesci infetti nonché traumi e ferite chirurgiche sono spesso alla base delle infezioni micobatteriche della cute e dei tessuti molli. La lesione granulomatosa solitaria si manifesta, sulla cute e/o nel sottocutaneo, poche settimane dopo l'infezione. Dita della mano, gomito, piedi, ginocchio, rappresentano sedi preferenziali. Spesso vengono interessati anche i linfonodi satelliti e si possono manifestare suppurazione, ulcerazione e cellulite. Non infrequente è la disseminazione cutanea della lesione.

La terapia medica, mirata in base ai risultati dell'antibiogramma eseguito secondo le indicazioni del CLSI (30), è generalmente efficace, anche se in alcuni casi è necessario ricorrere alla chirurgia.

Il rilevamento microscopico di micobatteri è abbastanza comune, mentre la crescita in coltura risulta spesso problematica. I campioni clinici provenienti da lesioni cutanee e sottocutanee vanno incubati, oltre alla routinaria temperatura di 37 °C, anche a 30 °C, poiché molte specie micobatteriche coinvolte hanno un *optimum* di crescita a temperature inferiori a quelle usuali.

La più nota delle micobatteriosi cutanee è quella dovuta a *Mycobacterium marinum* (10). Tale organismo, a lenta crescita, si sviluppa a temperatura inferiore ai 33 °C ed è fotocromogeno; è spesso presente nelle acque, sia dolci che salate, e provoca talvolta infezioni nei pesci. I soggetti che hanno contatti con i pesci, primi fra tutti gli acquariofili, sono fra i più frequenti bersagli dell'infezione. La lesione granulomatosa (fig. 4.3), interessante prevalentemente mani e braccia, si manifesta sotto forma di papula o di nodulo dal colorito rosso scuro e va frequentemente incontro a ulcerazione.

In alcuni casi, in fasi più tardive, assume carattere sporotricoide con formazione di una catena di piccoli noduli situati lungo il decorso dei vasi linfatici drenanti l'area. La guarigione può verificarsi spontaneamente, ma solo raramente, e mai prima di un paio di anni.

Recenti indagini *in vitro* hanno dimostrato che isolati clinici di *Mycobacterium marinum* sono pienamente sensibili solo a claritromicina, amikacina e minociclina, mentre resistenze nei confronti di doxiciclina, rifampicina e cotrimossazolo non sono rare. Fra i nuovi farmaci, il linezolid si distingue per l'attività *in vitro* e per le interessanti proprietà farmacocinetiche (11). L'esecuzione del test di sensibilità non è utile se non nei pazienti che rimangono positivi all'esame colturale dopo svariati mesi di terapia (30). Sebbene un protocollo standardizzato per la terapia delle infezioni da *Mycobacterium marinum* non sia stato ancora definito, fra i trattamenti più utilizzati si segnalano: l'associazione di rifampicina ed etambutolo, per almeno 3 mesi, oppure l'impiego in monoterapia di uno dei farmaci seguenti: doxiciclina, minociclina, cotrimossazolo o claritromicina (54, 82). Sembra tuttavia verosimile che la terapia basata sull'associazione di un farmaco ben tollerato come la clari-

tromicina, con etambutolo o con rifampicina sia quella dotata delle migliori potenzialità (28, 40, 54); tale trattamento dovrebbe essere protratto per almeno un paio di mesi dopo la guarigione clinica delle lesioni cutanee. Nel caso in cui siano compromessi i tessuti profondi può rendersi necessario il trattamento chirurgico (4, 28, 60, 94). Infezioni disseminate, anche se rare, possono verificarsi negli immunodepressi.

Mycobacterium marinum è il più comune, ma non l'unico responsabile di micobatteriosi umane contratte per contatto con pesci infetti; fra le altre specie coinvolte le più frequenti sono *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium chelonae*.

Mycobacterium ulcerans è l'agente dell'ulcera del Buruli, malattia cutanea largamente diffusa nelle aree tropicali di Africa e Australia (136). Si tratta della terza più frequente patologia micobatterica dopo tubercolosi e lebbra. *Mycobacterium ulcerans* cresce lentamente e soltanto a temperature prossime ai 30 °C; inoltre è scarsamente vitale in coltura. Le lesioni, che interessano prevalentemente le estremità e che sono tipicamente costituite da estese ulcerazioni necrotizzanti (fig. 4.4), non sono dolenti e contengono alte cariche di bacilli extracellulari con spiccata attività citotossica. La malattia non porta a morte ma, anche in caso di guarigione, è caratterizzata dalla formazione di cicatrici gravemente deturpanti. I bambini sono i soggetti più colpiti. Le acque dei fiumi e dei laghi rappresentano probabilmente il *reservoir* naturale di *Mycobacterium ulcerans*.

Il più efficace trattamento terapeutico dell'ulcera del Buruli è l'escissione chirurgica. Per garantire la completa rimozione del tessuto infetto è necessario praticare una resezione allargata della zona colpita, e il successo è direttamente proporzionale alla precocità dell'intervento (114). Sebbene molti agenti antimicrobici abbiano dimostrato un'eccellente attività *in vitro*, il ruolo degli antibiotici nella terapia di questa infezione rimane controverso. Recentemente una terapia di supporto all'escissione chirurgica basata sull'associazione di rifampicina e streptomina si è rivelata capace di inibire la crescita di *Mycobacterium ulcerans*, convertendo le lesioni precoci (noduli e placche) da microscopicamente positive a negative (42) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha deciso di raccomandarne l'impiego per una durata di 8 settimane (137). La vaccinazione con BCG sembra offrire una qualche protezione, almeno nei confronti delle forme più gravi (137, 141).

Mycobacterium marinum e *Mycobacterium ulcerans* sono strettamente correlati geneticamente tanto che nei test commerciali di ibridazione inversa condividono lo stesso pattern; le caratteristiche fenotipiche, ed in particolare la pigmentazione delle colonie, ne permettono tuttavia la differenziazione.

Un'altra specie che predilige cute e tessuti molli è *Mycobacterium haemophilum*, un organismo difficilmente coltivabile dato che richiede temperature di incubazione più basse di quelle usuali e terreni arricchiti con derivati del sangue (109). Gli immunocompromessi (pazienti con linfoma, trapiantati o HIV-positivi) sono i soggetti più a rischio. L'infezione si manifesta con ascessi dei tessuti molli e noduli cutanei che possono ulcerarsi e recidivare. Le lesioni sono dolorose e contengono bacilli sia intra che extracellulari. L'antibiotico chiave per la terapia sembra essere la rifampicina, che dovrebbe essere associata ad almeno un altro farmaco scelto fra etambutolo, ciprofloxacina e claritromicina (109).

Fra i micobatteri a crescita rapida, le specie più comuni coinvolte in infezioni post-traumatiche o secondarie a interventi chirurgici sono *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacte-*

rium abscessus (19) (fig. 4.5). Le lesioni nodulari o gli ascessi che si formano nel luogo della ferita chirurgica o del trauma vanno incontro a ulcerazioni e vi è coinvolgimento dei linfonodi satelliti. In generale, i micobatteri a crescita rapida sono resistenti *in vitro* ai farmaci antitubercolari, con la sola eccezione di *Mycobacterium smegmatis* che è sensibile all'etambutolo (140). La valutazione della sensibilità eseguita con la metodica della microdiluizione in brodo (30) è essenziale per la scelta della terapia e per monitorare l'insorgenza di resistenze nel corso di trattamenti prolungati (54). Sebbene le lesioni possano in alcuni casi guarire spontaneamente, l'impiego di associazioni di antibiotici è raccomandato (134). Lo schema di trattamento delle infezioni da *Mycobacterium fortuitum* include amikacina, cefoxitina, ciprofloxacina, sulfonamidi, imipenem e moxifloxacina. È stata riportata anche una qualche sensibilità a doxiciclina e claritromicina. I ceppi di *Mycobacterium abscessus* sono generalmente sensibili ad amikacina, cefoxitina e claritromicina/azitromicina, mentre per il trattamento delle infezioni da *Mycobacterium chelonae* la lista dei farmaci attivi include amikacina, linezolid, tobramicina (quest'ultima specie è l'unica in cui la tobramicina risulti più attiva dell'amikacina) e claritromicina.

La claritromicina rimane il farmaco di scelta per le infezioni localizzate causate da *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus* (19, 36, 104); ad essa generalmente si associa un farmaco iniettabile per le prime 2-6 settimane. La durata della terapia è solitamente di 4 mesi per le forme lievi e di 6 mesi per quelle più gravi. La chirurgia, affiancata alla terapia antibiotica, può garantire una completa guarigione, prevenendo eventuali recidive (19).

Vengono di seguito citati alcuni casi relativi a specie isolate meno comunemente, ma di cui esistono varie segnalazioni in letteratura. A *Mycobacterium goodii* sono state attribuite infezioni associate a interventi chirurgici (mammoplastica, artroplastica, riduzione di ernia inguinale, impianto di pacemaker) (17). *Mycobacterium mageritense* è stato isolato da varie ferite chirurgiche, di cui una successiva a liposuzione (139), mentre infezioni da *Mycobacterium monacense* (103) sono state riportate in un soggetto diabetico e in un giovane immunocompetente feritosi accidentalmente. Di *Mycobacterium wolinskyi* esistono report relativi a un caso di cellulite post-traumatica e a infezioni di ferite chirurgiche (120, 121).

Un cenno a parte meritano i numerosi *outbreak* di micobatteriosi cutanee segnalati recentemente, quasi sempre in relazione a interventi di tipo estetico (19, 138). All'origine c'è spesso un'iniezione (vaccini, allergeni, anestetici locali, ecc. per lo più confezionati in fiale multidose) o l'impiego di un disinfettante contaminato (80).

4.5. INFEZIONI OSTEO-ARTICOLARI

Le infezioni micobatteriche coinvolgenti sinovia, tendini, borsa e tessuto osseo hanno prevalentemente origine traumatica, soprattutto a seguito di fratture aperte, o iatrogena, in conseguenza di interventi chirurgici. L'evoluzione in osteomielite è assai frequente. Le tenosinoviti colpiscono le fasce tendinee, manifestandosi con tumefazione e perdita di funzionalità. A volte la lesione evolve dando luogo a fistolizzazione.

Nelle osteiti lo sviluppo di lesioni granulomatose si accompagna a necrosi ossea. Importanti condizioni predisponenti sono il reumatismo articolare e il trattamento con steroidi.

In mancanza di studi clinici randomizzati, basati sul confronto di differenti protocolli terapeutici, non esistono linee guida per il trattamento delle infezioni osteo-articolari causate da MNT. La stragrande maggioranza delle specie coinvolte sono a crescita rapida e la loro corretta identificazione, realizzabile nella maggior parte dei casi soltanto ricorrendo al sequenziamento genico, è alla base di una terapia appropriata che deve avvalersi anche dei dati di sensibilità ottenuti seguendo le procedure raccomandate dal CLSI (30). Tale trattamento, insieme alla toilette chirurgica, costituisce oggi l'unico presidio terapeutico efficace.

Mycobacterium haemophilum (142), *Mycobacterium kansasii* (51) e MAC (65) sono stati segnalati come responsabili di artrite settica, talvolta accompagnata da osteomielite e da sinovite, soprattutto in pazienti con AIDS. Fra le altre specie coinvolte si segnalano *Mycobacterium asiaticum* (48), *Mycobacterium flavescens* (127), *Mycobacterium szulgai* (58), *Mycobacterium thermoresistibile* (146) e *Mycobacterium xenopi* (151).

Non sono eccezionali interessamenti osteo-articolari secondari a infezioni cutanee da *Mycobacterium marinum*.

Nella pubblicazione che descrive la nuova specie *Mycobacterium goodii* (17), basata sui 28 ceppi, sono segnalati nove casi di osteomielite e cinque di cellulite, due dei quali associati a osteomielite. I pazienti, quasi tutti giovani, erano reduci da traumi, per lo più fratture esposte e penetrazione di corpi estranei; due casi di osteomielite, uno allo sterno e uno al femore, erano invece conseguenti a interventi chirurgici.

Altre segnalazioni (120, 121) riguardano il coinvolgimento di *Mycobacterium immunogenum*, *Mycobacterium lacus* e *Mycobacterium goodii* in episodi di borsite, di *Mycobacterium mageritense* in un caso di osteomielite a seguito di un intervento di riduzione di una frattura e di *Mycobacterium wolinskyi* in infezioni di ferite cardiocirurgiche e post-traumatiche. In un caso di tenosinovite alla mano è stato isolato *Mycobacterium branderi*.

Un importante capitolo delle infezioni osteo-articolari ad eziologia micobatterica è costituito dalle spondilodisciti. Di molte di esse è responsabile il micobatterio tubercolare, ma non sono rare quelle dovute a *Mycobacterium xenopi* (33). Altre specie, fra cui *Mycobacterium lentiflavum*, sono state riportate di recente (120, 121).

Casi di osteomielite disseminata, ancorché piuttosto rari, si riscontano prevalentemente in pazienti con deficit del sistema immunitario su base genetica (88).

4.6. INFEZIONI DISSEMINATE E SEPSI

A parte rarissimi casi, le infezioni disseminate da MNT insorgono in corso di grave immunodepressione; le più conosciute sono quelle riscontrate, con notevole frequenza negli anni che hanno preceduto l'introduzione di efficaci terapie antiretrovirali, nei soggetti affetti da AIDS. A seguito di tali terapie il fenomeno si è drasticamente ridimensionato nei pazienti HIV-positivi, ma le infezioni stanno trovando un bersaglio altrettanto appetibile nel crescente numero di individui trattati con farmaci immunosoppressori, primi fra tutti i trapiantati, nei soggetti affetti da emopatie maligne, nonché in quelli con deficienze immunitarie genetiche.

4.6.1. INFEZIONI DISSEMINATE IN AIDS

Le infezioni micobatteriche disseminate sono state fra le prime infezioni opportunistiche segnalate nei soggetti HIV-positivi. Fra i pazienti con AIDS aventi un numero di linfociti CD4+ inferiore a 100/ μ L circa la metà sono soggetti a infezioni micobatteriche disseminate (31).

La via di ingresso può essere rappresentata dall'apparato respiratorio o dal tratto gastrointestinale. Il coinvolgimento di quest'ultimo distretto sembra supportato dal reperto di voluminose placche di Peyer, di linfonodi mesenterici ingrossati, di erosioni intestinali nonché dalla frequentissima sintomatologia diarroica cronica. I principali segni e sintomi comprendono febbre elevata e continua, diarrea, perdita di peso, dolori addominali, sudorazione, singhiozzo, anemia, epato e splenomegalia, anoressia, mialgia. La progressione della malattia è estremamente rapida e, in assenza di cure, può portare a morte.

La ben nota difficoltà dell'attribuzione di significatività clinica all'isolamento di MNT è ulteriormente accresciuta nel paziente HIV-positivo, in cui una netta distinzione fra colonizzazione e condizione patologica può essere in molti casi impossibile. Vi sono tuttavia delle circostanze in cui nessun dubbio può sussistere, quando cioè l'isolamento del ceppo sia stato ottenuto da materiale biotico, polmonare o intestinale, o da sangue. La ricerca di micobatteri nel sangue, ed eventualmente in una biopsia osteo-midollare, costituiscono il metodo di elezione per la diagnosi delle micobatteriosi disseminate.

È ben noto che i micobatteri facenti parte del MAC sono di gran lunga quelli più frequentemente coinvolti in infezioni in AIDS, tanto che è stato ipotizzato che essi contribuiscano all'aggravamento dell'immunodepressione (79). Il coinvolgimento delle specie incluse nel MAC è pesantemente sbilanciato (4/1) a favore di *Mycobacterium avium*, con *Mycobacterium intracellulare* responsabile di una percentuale di casi nettamente più bassa; tale dato è in chiaro contrasto con quanto si riscontra fra i soggetti HIV-negativi, nei quali *Mycobacterium intracellulare* rappresenta anzi, sia pur di misura, la specie prevalente. Molto recentemente sono stati riportati anche casi di infezioni disseminate imputabili a *Mycobacterium colombiense*, una delle nuove specie descritte recentemente all'interno del MAC (122).

Mycobacterium genavense è un microrganismo che non cresce sui comuni terreni solidi per micobatteriologia e che, anche in terreno liquido, richiede tempi di incubazione estremamente lunghi. Queste difficoltà colturali fanno ritenere che i casi segnalati, peraltro non rarissimi, costituiscano solo la punta dell'iceberg, tanto che l'incidenza reale è stata stimata pari a 1/10 di quella del MAC (95).

Praticamente tutte le specie micobatteriche figurano nell'elenco degli agenti di infezioni disseminate in AIDS; fra i reperti più comuni sono state segnalate *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium haemophilum*. Anche *Mycobacterium gordonae*, la specie micobatterica non patogena per eccellenza, è stata riportata più volte. Esistono inoltre varie segnalazioni relative a infezioni micobatteriche miste.

Il motivo per cui certe specie risultano coinvolte con frequenza notevolmente superiore rispetto ad altre rimane ancora sconosciuto. Le specie che hanno maggior probabilità di colonizzare i pazienti, ed eventualmente di causare patologie, non sempre sono infatti quelle più diffuse nell'ambiente; tipico esempio è *Mycobacterium xenopi*, la specie che in molte Nazioni europee, Italia inclusa, è di gran lunga prevalente, i cui isolamenti in AIDS sono sporadici. Né è vero che le specie più

comunemente coinvolte sono quelle dotate di maggior virulenza, dal momento che *Mycobacterium malmoeense*, uno dei MNT più frequentemente associati a malattia, è stato isolato raramente in AIDS persino nei Paesi scandinavi dove la frequenza di isolamento è particolarmente elevata.

Il trattamento delle infezioni disseminate da micobatteri non tubercolari non si differenzia sostanzialmente da quello raccomandato, a parità di specie, nelle infezioni localizzate. Fra i farmaci antimicobatterici spiccano i macrolidi per la loro attività verso molte delle specie più comunemente coinvolte, incluse anche quelle a crescita rapida (57). Efficaci in molti casi sono anche rifamicine, aminoglicosidi, chinoloni ed etambutolo. Per le infezioni da MAC sono state impiegate varie associazioni; i protocolli attualmente consigliati prevedono l'uso di claritromicina ed etambutolo (75) con l'eventuale aggiunta della rifabutina. La terapia, come anche la profilassi, può essere sospesa nei pazienti che rispondono ai farmaci antivirali (75). La possibile comparsa di resistenze durante la terapia orienta la prognosi in senso sfavorevole.

L'impiego di terapie antiretrovirali sempre più efficaci permette oggi di contenere l'attività patogena di HIV e di mantenere il livello dei linfociti CD4+ al di sopra dei limiti di rischio di infezione micobatterica. Quando tuttavia questo risultato non può essere ottenuto, come nel caso di infezioni da ceppi HIV-resistenti ai farmaci antiretrovirali, il rischio di micobatteriosi disseminata rimane elevato. In tali pazienti è fortemente raccomandata la profilassi con un macrolide non appena il numero di linfociti CD4+ scende al di sotto di 50 cellule/ μ L (75).

4.6.2. INFEZIONI DISSEMINATE NELL'IMMUNODEPRESSO HIV-NEGATIVO

Al di fuori dell'infezione da HIV, numerose sono le cause di immunodepressione. A quelle congenite e acquisite si sono aggiunte da tempo quelle di origine iatrogena, ed è indubbio che il loro numero sia destinato ad aumentare con l'incremento delle conoscenze in campo immunologico. È quindi prevedibile una crescita parallela anche per ciò che riguarda le complicanze infettive.

Avendo i linfociti CD4+, assieme a interferone- γ (IFN- γ) e *tumor necrosis factor*- α (TNF- α), un ruolo cruciale nella difesa dai microrganismi intracellulari, non meraviglia che le infezioni da micobatteri, e in particolare le forme disseminate, figurino ai primi posti fra le complicanze delle immunodeficienze in cui tali linee cellulari, o tali citochine, sono coinvolte. È questo il caso, fra le immunodeficienze congenite, della linfopenia CD4+ idiopatica, nel cui ambito sono state riportate infezioni disseminate da MAC (68). È anche il caso delle alterazioni relative all'IFN- γ , siano esse congenite (mutazioni riguardanti i recettori IFN- γ -specifici a livello delle cellule immunitarie) o acquisite (produzione di autoanticorpi anti-IFN- γ). In questo ambito sono stati segnalati svariati casi di infezione disseminata da MAC o da micobatteri a crescita rapida, per alcuni dei quali la somministrazione terapeutica di IFN- γ si è rivelata efficace.

Il TNF- α , assieme a IFN- γ e *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, svolge un'importante funzione di attivazione sui macrofagi, rendendoli capaci di uccidere i micobatteri. È per tale motivo che, al ricorso alla terapia biologica (a base di anticorpi anti-TNF- α) per il trattamento di svariate patologie, sono non di rado associate infezioni micobatteriche disseminate, spesso refrattarie alla terapia (92).

Fra i trapianti solidi, il trapianto di rene è di gran lunga il più comune e, ovviamente, è anche quello per cui è stato riportato il maggior numero di complicanze infettive (115). Fra le specie responsabili di infezioni disseminate si segnalano soprattutto MAC, *Mycobacterium haemophilum* e *Mycobacterium genavense*.

Non meno a rischio sono i pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo. In tali soggetti, in grande maggioranza trapiantati con cellule staminali allogeniche, sono state riportate elevate incidenze di micobatteriosi, anche disseminate, in particolare nei pazienti linfociti T-depleted (10%), ma anche (7%) nei non T-depleted (143). *Mycobacterium haemophilum* e MAC figurano ancora ai primi posti.

Il trattamento dei tumori con antitumorali è notoriamente un fattore predisponente alle infezioni disseminate, ivi incluse quelle da MNT. Fra le patologie neoplastiche ematologiche, la leucemia a cellule capellute e la leucemia mieloide cronica sono quelle associate a maggior rischio (133). Anche se sono riportate infezioni dovute a MAC e a *Mycobacterium kansasii*, le specie più frequentemente isolate dal sangue sono quelle a crescita rapida, soprattutto *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium neoaurum* (19), ma sono stati segnalati anche casi imputabili a *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium septicum* e *Mycobacterium wolinskyi* (120, 121).

Molto spesso, come nel caso dei pazienti in dialisi (93), la sepsi è provocata da un catetere infetto; in tali circostanze l'ipotesi di un'infezione micobatterica dovrebbe essere presa in considerazione ogniqualvolta, in presenza di febbre, le emocolture per germi comuni risultino negative o presentino morfologie bacillari simil-difteroidi (tali possono infatti apparire i micobatteri alla colorazione di Gram). La rimozione tempestiva del catetere e l'impiego di terapie mirate risultano quasi sempre risolutive.

Fra le sepsi successive a intervento chirurgico, le più frequenti riguardano interventi di chirurgia cardiaca.

4.7. MYCOBACTERIUM AVIUM PARATUBERCULOSIS E MORBO DI CROHN

Mycobacterium avium paratuberculosis è una delle quattro sottospecie di *Mycobacterium avium*, essendo le altre *Mycobacterium avium avium*, *Mycobacterium avium hominissuis* e *Mycobacterium avium silvaticum*. Tale collocazione tassonomica è dovuta alla strettissima correlazione esistente, a livello genetico, fra le quattro sottospecie; una correlazione simile non si riscontra però a livello fenotipico, dato che *Mycobacterium avium paratuberculosis* è caratterizzato da una crescita estremamente lenta che può richiedere vari mesi di incubazione e che può essere ottenuta esclusivamente su terreni di coltura addizionati con micobattina (un composto coinvolto nel trasporto del ferro).

Mycobacterium avium paratuberculosis è responsabile di una patologia infiammatoria cronica, nota come "paratubercolosi" o "morbo di Johne", che colpisce l'intestino di molte specie di ruminanti, bovini e ovini in primo luogo (25). L'isolamento del microrganismo dal latte e dagli organi interni di animali infetti è piuttosto frequente.

Il morbo di Crohn è una malattia multifattoriale, ad eziologia sconosciuta, che colpisce l'uomo; si manifesta con dolori addominali, diarrea e perdita di peso ed è caratterizzata da un processo infiammatorio cronico che interessa principalmente l'ileo terminale. Le numerose analogie epidemiologiche e cliniche esistenti fra la paratubercolosi dei ruminanti e il morbo di Crohn hanno indotto molti ricercatori a ipotizzare anche per quest'ultimo l'eziologia infettiva da *Mycobacterium avium paratuberculosis* e alcuni di essi hanno isolato tale microrganismo, o lo hanno messo in evidenza

mediante amplificazione genica, in biopsie intestinali provenienti da pazienti affetti da tale malattia. Al momento attuale non esistono prove certe che confermino tale ipotesi patogenetica, infatti sono altrettanto numerosi gli studiosi che sostengono che la relazione fra *Mycobacterium avium paratuberculosis* e morbo di Crohn sia casuale o che, al massimo, l'infezione micobatterica possa essere solo uno dei co-fattori della malattia (26, 69, 87).

BIBLIOGRAFIA

1. Ahn C.H., Lowell J.R., Onstad G.D., Ahn S.S., Hurst G.A., *Elimination of Mycobacterium intracellulare from sputum after bronchial hygiene*, 1979, *Chest*; 76:480-482.
2. Aksamit T.R., *Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients with pre-existing lung disease*, 2002, *Clin Chest Med*; 23:643-653.
3. Alcaide F., Calatayud L., Santin M., Martin R., *Comparative in vitro activities of linezolid, telithromycin, clarithromycin, levofloxacin, moxifloxacin, and four conventional antimycobacterial drugs against Mycobacterium kansasii*, 2004, *Antimicrob Agents Chemother*; 48:4562-4565.
4. Alloway J.A., Evangelisti S.M., Sartin J.S., *Mycobacterium marinum arthritis*, 1995, *Semin Arthritis Rheum*; 24:382-390.
5. Arend S.M., Cerda D.P., de Haas P., Janssen R., Hoeve M.A., Verhard E.M., Ottenhoff T.H., van Soolingen D., van Dissel J.T., *Pneumonia caused by Mycobacterium kansasii in a series of patients without recognised immune defect*, 2004, *Clin Microbiol Infect*; 10:738-748.
6. Armstrong K.L., James R.W., Dawson D.J., Francis P.V., Masters B., *Mycobacterium haemophilum causing perihilar or cervical lymphadenitis in healthy children*, 1992, *J Pediatr*; 121:202-205.
7. Bang D., Herlin T., Stegger M.B., Andersen A.B., Torkko P., Tortoli E., Thomsen B.V., *Mycobacterium arosiense sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child*, 2008, *Int J Syst Evol Microbiol*; 58:2398-2402.
8. Bell R.C., Higuchi J.H., Donovan W.N., Krasnow I., Johanson W.G. Jr., *Mycobacterium simiae: clinical features and follow up of twenty-four patients*, 1983, *Am Rev Respir Dis*; 127:35-38.
9. Ben Salah I., Cayrou C., Raoult D., Drancourt M., *Mycobacterium marseillense sp. nov., Mycobacterium timonense sp. nov. and Mycobacterium bouchedorhonense sp. nov., novel species in the Mycobacterium avium complex*, 2009, *Int J Syst Evol Microbiol*; 59:2803-2808.
10. Blackwell V., *Mycobacterium marinum infections*, 1999, *Curr Opin Infect Dis*; 12:181-184.
11. Braback M., Riesbeck K., Forsgren A., *Susceptibilities of Mycobacterium marinum to gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, linezolid, moxifloxacin, telithromycin, and quinupristin-dalfopristin (Synercid) compared to its susceptibilities to reference macrolides and quinolones*, 2002, *Antimicrob Agents Chemother*; 46:1114-1116.
12. British Thoracic Society, *Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee guidelines 1999*, 2000, *Thorax*; 55:210-218.
13. British Thoracic Society Research Committee, *Mycobacterium kansasii pulmonary infection: a prospective study of the results of nine months of treatment with rifampicin and ethambutol*, 1994, *Thorax*; 49:442-445.
14. British Thoracic Society Research Committee, *First randomized trial of the pulmonary disease caused by Mycobacterium avium-intracellulare, Mycobacterium malmoense, Mycobacterium xenopi in HIV-negative patients: rifampicin versus ethambutol and isoniazid versus rifampicin and ethambutol*, 2001, *Thorax*; 56:167-172.

15. British Thoracic Society Research Committee, *Pulmonary disease caused by Mycobacterium avium-intracellulare in HIV-negative patients: 5-year follow-up of patients receiving standardized treatment*, 2002, *Int J Tuberc Lung Dis*; 6:628-634.
16. British Thoracic Society Research Committee, *Pulmonary disease caused by Mycobacterium malmoense in HIV-negative patients: 5-year follow-up of patients receiving standardized treatment*, 2003, *Eur Respir J*; 21:478-482.
17. Brown B.A., Springer B., Steingrube V.A., Wilson R.W., Pfyffer G.E., Garcia M.J., Menendez M.C., Rodriguez-Salgado B., Jost K.C. Jr., Chiu S.H., Onyi G.O., Böttger E.C., Wallace R.J. Jr., *Mycobacterium wolinskyi sp. nov. and Mycobacterium goodii sp. nov. rapidly growing species related to Mycobacterium smegmatis and associated with human wound infections: a cooperative study from the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy*, 1999, *Int J Syst Bacteriol*; 49:1493-1511.
18. Brown-Elliott B.A., Griffith D.E., Wallace R.J. Jr., *Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria*, 2002, *Infect Dis Clin North Am*; 16:187-220.
19. Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr., *Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria*, 2002, *Clin Microbiol Rev*; 15:716-746.
20. Bruijnesteijn van Coppenraet L.E., Kuijper E.J., Lindeboom J.A., Prins J.M., Claas E.C., *Mycobacterium haemophilum and lymphadenitis in children*, 2005, *Emerg Infect Dis*; 11:62-68.
21. Buchholz U.T., McNeil M.M., Keyes L.E., Good R.C., *Mycobacterium malmoense infections in the United States, January 1993 through June 1995*, 1998, *Clin Infect Dis*; 27:551-558.
22. Butler W.R., O'Connor S.P., Yakrus M.A., Gross W.M., *Cross-reactivity of genetic probe for detection of Mycobacterium tuberculosis with newly described species Mycobacterium celatum*, 1994, *J Clin Microbiol*; 32:536-538.
23. Bux-Gewehr I., Hagen H.P., Rüscher S., Feurle G.E., *Fatal pulmonary infection with Mycobacterium celatum in an apparently immunocompetent patient*, 1998, *J Clin Microbiol*; 36:587-588.
24. Casanova J.L., Abel L., *Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model*, 2002, *Annu Rev Immunol*; 20:581-620.
25. Chacon O., Bermudez L.E., Barletta R.G., *Johne's disease, inflammatory bowel disease, and Mycobacterium paratuberculosis*, 2004, *Annu Rev Microbiol*; 58:329-363.
26. Chamberlin W., Graham D.Y., Hulten K., El-Zimaity M., Schwartz M.R., Naser S., Shafran I., El-Zaatari F.A., *Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease*, 2001, *Aliment Pharmacol Ther*; 15:337-346.
27. Cheng V.C., Yew W.W., Yuen K.Y. *Molecular diagnostics in tuberculosis*, 2005, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 24:711-720.
28. Chow S.P., Ip F.K., Lau J.H.K., Collins J., Luk K.D.K., Pun W.K., *Mycobacterium marinum infection in the hand and wrist. Results of conservative treatment in twenty-four cases*, 1987, *J. Bone Joint Surg [Br]*; 69A:1161-1168.
29. Christiansen D.C., Roberts G.D., Patel R., *Mycobacterium celatum, an emerging pathogen and cause of false positive amplified Mycobacterium tuberculosis direct test*, 2004, *Diagn Microbiol Infect Dis*; 49:19-24.

30. CLSI, *Susceptibility testing for mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes; approved standard M24-A2*, Wayne, PA, 2011.
31. Collins F.M., *Mycobacterial disease, immunosuppression and acquired immunodeficiency syndrome*, 1989, Clin Microbiol Rev; 2:360-377.
32. Contreras M.A., Cheung O.T., Sanders D.E., Goldstein R.S., *Pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria*, 1988, Am Rev Respir Dis; 137:149-152.
33. Danesh-Clough T., Theis J.C., van der Linden A., *Mycobacterium xenopi infection of the spine: a case report and literature review*, 2000, Spine; 25:626-628.
34. Davidson P.T., *Mycobacterium szulgai, a new pathogen causing infection in the lung*, 1976, Chest; 69:799-801.
35. Davies P.D.O., *Infection with Mycobacterium kansasii*, 1994, Thorax; 49:435-436.
36. De Groote M.A., Huitt G., *Infections due to rapidly growing mycobacteria*, 2006, Clin Infect Dis; 42:1756-1763.
37. Debrunner M., Salfinger M., Brändly O., von Graevenitz A., *Epidemiology and clinical significance of nontuberculous mycobacteria in patients negative for human immunodeficiency virus in Switzerland*, 1992, Clin Infect Dis; 15:330-345.
38. Dhillon S.S., Watanakunakorn C., *Lady Windermere syndrome: middle lobe bronchiectasis and Mycobacterium avium complex infection due to voluntary cough suppression*, 2000, Clin Infect Dis; 30:572-575.
39. Donnabella V., Salazar-Schicchi J., Bonk S., Hanna B., Rom W.N., *Increasing incidence of Mycobacterium xenopi at Bellevue hospital: an emerging pathogen or a product of improved laboratory methods?*, 2000, Chest; 118:1365-1370.
40. Edelstein H., *Mycobacterium marinum skin infections, Report of 31 cases and review of the literature*, 1994, Arch Intern Med; 154:1359-1364.
41. Enzensberger R., Hunfeld K.P., Krause M., Rüsich-Gerdes S., Brade V., Boddinhaus B., *Mycobacterium malmoense infections in immunocompetent patients*, 1999, Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 18:579-581.
42. Etuafu S., Carbonnelle B., Grosset J., Lucas S., Horsfield C., Phillips R., Evans M., Ofori-Adjei D., Klustse E., Owusu-Boateng J., Amedofu G.K., Awuah P., Ampadu E., Amofah G., Asiedu K., Wansbrough-Jones M., *Efficacy of the Combination rifampin-streptomycin in preventing growth of Mycobacterium ulcerans in early lesions of Buruli ulcer in humans*, 2005, Antimicrob Agents Chemother; 49:3182-3186.
43. Evans A.J., Crisp A.J., Hubbard R.B., Colville A., Evans S.A., Johnston I.D.A., *Pulmonary Mycobacterium kansasii infection: comparison of radiological appearances with pulmonary tuberculosis*, 1996, Thorax; 51:1243-1247.
44. Falkinham J.O. III, *Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria*, 1996, Clin Microbiol Rev; 9:177-215.
45. Field S.K., Cowie R.L., *Treatment of Mycobacterium avium-intracellulare complex lung disease with a macrolide, ethambutol, and clofazimine*, 2003, Chest; 124:1482-1486.
46. Field S.K., Cowie R.L., *Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria*, 2006, Chest; 129:1653-1672.
47. Field S.K., Fisher D., Cowie R.L., *Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients without HIV infection*, 2004, Chest; 126:566-581.

48. Foulkes G.D., Floyd J.C.P., Stephens J.L., *Flexor tenosynovitis due to Mycobacterium asiaticum*, 1998, J Hand Surg [Am]; 23A:753-756.
49. Fujikane T., Fujiuchi S., Yamazaki Y., Matsumoto H., Takahashi M., Fujita Y., Shimizu T., Kikuchi K., *Efficacy and outcomes of clarithromycin treatment for pulmonary MAC disease*, 2005, Int J Tuberc Lung Dis; 9:1281-1287.
50. Fujita J., Ohtsuki Y., Suemitsu I., Shigeto E., Yamadori I., Obayashi Y., Miyawaki H., Dobashi N., Matsushima T., Takahara J., *Pathological and radiological changes in resected lung specimens in Mycobacterium avium intracellulare complex disease*, 1999, Eur Respir J; 13:535-540.
51. Glickstein S.L., Nashel D.J., *Mycobacterium kansasii septic arthritis complicating rheumatic disease: case report and review of the literature*, 1987, Semin Arthritis Rheum; 16:231-235.
52. Good R.C., Silcox V.A., Kilburn J.O., Plikaytis B.D., *Identification and drug susceptibility test results for Mycobacterium spp.*, 1985, Clin Microbiol News; 7:133-136.
53. Green P.A., von Reyn C.F., Smith P.R. Jr., *Mycobacterium avium complex parotid lymphadenitis: successful therapy with clarithromycin and ethambutol*, 1993, Pediat Infect Dis J; 12:615-617.
54. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B.A., Catanzarro A., Daley C., Gordin F., Holland S.M., Horsburg R., Huitt G., Iademarco M.F., Iseman M., Olivier K., Rouss S., von Reyn C.F., Wallace R.J. Jr., Winthrop K., ATS Mycobacterial Disease Subcommittee, American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America, *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*, 2007, Am J Respir Crit Care Med; 165:367-416.
55. Griffith D.E., Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr., *Thrice-weekly clarithromycin-containing regimen for treatment of Mycobacterium kansasii lung disease: results of a preliminary study*, 2003, Clin Infect Dis; 37:1178-1182.
56. Griffith D.E., Girard W.M., Wallace R.J. Jr., *Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing Mycobacteria, An analysis of 154 patients*, 1993, Am Rev Respir Dis; 147:1271-1278.
57. Griffith D.E., Wallace R.J. Jr., *New developments in the treatment of nontuberculous mycobacterial (NTM) disease*, 1996, Semin Respir Infect; 11:301-310.
58. Hakawi A.M., Alrajhi A.A., *Septic arthritis due to Mycobacterium szulgai in a patient with human immunodeficiency virus: case report*, 2005, Scand J Infect Dis; 37:235-237.
59. Hall L., Roberts G.D., *Non-molecular identification of nontuberculous mycobacteria in the clinical microbiology laboratory: what's the real deal?*, 2006, Clin Microbiol News; 28:80.
60. Harth M., Ralph E.D., Faraawi R., *Septic arthritis due to Mycobacterium marinum*, 1994, J Rheumatol; 21:957-960.
61. Hazra R., Robson C.D., Perez-Atayde A.R., Husson R.N., *Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy*, 1999, Clin Infect Dis; 28:123-129.
62. Heginbotham M.L., *The relationship between the in vitro drug susceptibility of opportunist mycobacteria and their in vivo response to treatment*, 2001, Int J Tuberc Lung Dis; 5:539-545.
63. Henriques B., Hoffner S.E., Petrini B., Juhlin I., Wåhlén P., Källénus G., *Infection with Mycobacterium malmoense in Sweden, Report of 221 cases*, 1994, Clin Infect Dis; 18:596-600.
64. Herdman A.V., Steele J.C. Jr., *The new mycobacterial species-emerging or newly distinguished pathogens*, 2004, Clin Lab Med; 24:651-690.

65. Hoffman G.S., Myers R.L., Stark F.R., Thoen C.O., *Septic arthritis associated with Mycobacterium avium: a case report and literature review*, 1978, *J Rheumatol*; 5:199-209.
66. Hoffner S.E., Henriques B., Petrini B., Källenius G., *Mycobacterium malmoense: an easily missed pathogen*, 1991, *J Clin Microbiol*; 29:2673-2674.
67. Hoffner S.E., Hjelm U., Källenius G., *Susceptibility of Mycobacterium malmoense to antibacterial drugs and drug combinations*, 1993, *Antimicrob Agents Chemother*; 37:1285-1288.
68. Holland S.M., Eisenstein E.M., Kuhns D.B., Turner M.L., Fleisher T.A., Strober W., Gallin J.I., *Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. A preliminary report*, 1994, *N Engl J Med*; 330:1348-1355.
69. Hubbard J., Surawicz C.M., *Etiological role of mycobacterium in Crohn's disease - An assessment of the literature*, 1999, *Dig Dis*; 17:6-13.
70. Inderlied C.B., Kemper C.A., Bermudez L.E.M., *The Mycobacterium avium complex*, 1993, *Clin Microbiol Rev*; 6:266-310.
71. Jacobson K., Garcia H., Libshitz H., Whimbey E., Rolston K., Abi-Said D., Raad I., *Clinical and radiological features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria in cancer patients*, 1998, *J Clin Microbiol Infect*; 17:615-621.
72. Jacobson K.L., Teira R., Libshitz H.I., Raad I., Rolston K.V., Tarrand J., Whimbey E., *Mycobacterium kansasii infections in patients with cancer*, 2000, *Clin Infect Dis*; 30:965-969.
73. Jenkins P.A., Campbell I.A., *Pulmonary disease caused by Mycobacterium xenopi in HIV-negative patients: five year follow-up of patients receiving standardised treatment*, 2003, *Respir Med*; 97:439-444.
74. Jiva T.M., Jacoby H.M., Weymouth L.A., Kaminski D.A., Portmore A.C., *Mycobacterium xenopi: innocent bystander or emerging pathogen?*, 1997, *Clin Infect Dis*; 24:226-232.
75. Karakousis P.C., Moore R.D., Chaisson R.E., *Mycobacterium avium complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy*, 2004, *Lancet Infect Dis*; 4:557-565.
76. Khor A., Leslie K.O., Tazelaar H., Helmers R.A., Colby T.V., *Diffuse pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria in immunocompetent people (hot tub lung)*, 2001, *Am J Clin Pathol*; 115:755-762.
77. Kubo K., Yamazaki Y., Hachiya T., Hayasaka M., Honda T., Hasegawa M., Sone S., *Mycobacterium avium-intracellulare pulmonary infection in patients without known predisposing lung disease*, 1998, *Lung*; 176:381-391.
78. Lam P.K., Griffith D.E., Aksamit T.R., Ruoss S.J., Garay S.M., Daley C.L., Catanzaro A., *Factors related to response to intermittent treatment of Mycobacterium avium complex lung disease*, 2006, *Am J Respir Crit Care Med*; 173:1283-1289.
79. Lane H.C., Fauci A.S., *Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome*, 1985, *Annu Rev Immunol*; 3:477-500.
80. Leao S.C., Tortoli E., Viana-Niero C., Ueki S.Y., Lima K.V., Lopes M.L., Yubero J., Menendez M.C., Garcia M.J., *Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests a revision of the taxonomic status of members of the Mycobacterium chelonae-abscessus group*, 2009, *J Clin Microbiol*; 47:2691-2698.
81. Levin D.L. *Radiology of pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare complex*, 2002, *Clin Chest Med*; 23:603-612.

82. Lewis F.M., Marsh B.J., von Reyn C.F., *Fish tank exposure and cutaneous infections due to Mycobacterium marinum: tuberculin skin testing, treatment, and prevention*, 2003, Clin Infect Dis; 37:390-397.
83. Lillo M., Orengo S., Cernoch P., Harris R.L., *Pulmonary and disseminated infection due to Mycobacterium kansasii: a decade of experience*, 1990, Rev Infect Dis; 12:760-767.
84. Linheboom J.A., Kuiper E.J., Bruijnesteijn Van Coppenraet E.S., Linderboom R., Prins J.M., *Surgical excision versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a multicenter, randomized, controlled trial*, 2007, Clin Infect Dis; 44:1057-1064.
85. Ludwig E., Reischl U., Holzmann T., Melzl H., Janik D., Gilch C., Hermanns W., *Risk for Mycobacterium celatum infection from ferret*, 2011, Emerg Infect Dis; 17:553-555.
86. Mangione E.J., Huitt G., Lenaway D., Beebe J., Bailey A., Figoski M., Rau M.P., Albrecht K.D., Yakrus M.A., *Nontuberculous mycobacterial disease following hot tub exposure*, 2001, Emerg Infect Dis; 7:1039-1042.
87. Manning E.J., *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: a review of current knowledge*, 2001, J Zoo Wildlife Med; 32:293-304.
88. Marazzi M.G., Chappier A., Defilippi A.C., Pistoia V., Mangini S., Savioli C., Dell'Acqua A., Feinberg J., Tortoli E., Casanova J.L., *Disseminated Mycobacterium scrofulaceum infection in a child with interferon-gamma receptor 1 deficiency*, 2010, Int J Infect Dis; 14:e167-170.
89. Marras T.K., Wallace R.J. Jr., Koth L.L., Stulbarg M.S., Cowl C.T., Daley C.L., *Hypersensitivity pneumonitis reaction to Mycobacterium avium in household water*, 2005, Chest; 127:664-671.
90. Nelson K.G., Griffith D.E., Brown B.A., Wallace R.J., *Results of operation in Mycobacterium avium-intracellulare lung disease*, 1998, Ann Thorac Surg; 66:325-330.
91. Obayashi Y., Fujita J., Suemitsu I., Kamei T., Nii M., Takahara J., *Clinical features of non-tuberculous mycobacterial disease: comparisons between smear-positive and smear-negative cases, and between Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare*, 1998, Int J Tuberc Lung Dis; 2:597-602.
92. Okubo H., Iwamoto M., Yoshio T., Okazaki H., Kato T., Bando M., Minota S., *Rapidly aggravated Mycobacterium avium infection in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab*, 2005, Mod Rheumatol; 15:62-64.
93. Otaki Y., Nakanishi T., Nanami M., Aizawa M., Yanase K., Hiraoka K., Izumi M., Inoue T., Takamitsu Y., Arakawa A., Adachi M., Maruo S., *A rare combination of sites of involvement by Mycobacterium intracellulare in a hemodialysis patient: multifocal synovitis, spondylitis, and multiple skin lesions*, 2002, Nephron; 92:730-734.
94. Patel S., Duke O., Harland C., *Septic arthritis due to Mycobacterium marinum [letter]*, 1995, J Rheumatol; 22:1607-1608.
95. Pechère M., Opravil M., Wald A., Chave J.P., Bessesen M., Sievers A., Hein R., von Overbeck J., Clark R.A., Tortoli E., Emler S., Kirschner P., Gabriel V., Böttger E.C., Hirschel B., the Swiss HIV Cohort Study, *Clinical and epidemiological features of infection with Mycobacterium genavense*, 1995, Arch Intern Med; 155:400-404.
96. Phillips P., Bonner S., Getaric N., Bai T., Wilcox P., Hogg R., O'Shaughnessy M., Montaner J., *Nontuberculous mycobacterial immune reconstitution syndrome in HIV-infected patients: spectrum of disease and long-term follow-up*, 2005, Clin Infect Dis; 41:1483-1497.

97. Piersimoni C., Goteri G., Nista D., Mariottini A., Mazzarelli G., Bornigia S., *Mycobacterium lentiflavum* as an emerging causative agent of cervical lymphadenitis, 2004, *J Clin Microbiol*; 42:3894-3897.
98. Piersimoni C., Tortoli E., de Lalla F., Nista D., Donato D., Bornigia S., De Sio G., *Isolation of Mycobacterium celatum from patients infected with human immunodeficiency virus*, 1997, *Clin Infect Dis* ; 24:144-147.
99. Piersimoni C., Zitti P.G., Nista D., Bornigia S., *Mycobacterium celatum pulmonary infection in the immunocompetent: case report and review*, 2003, *Emerg Infect Dis*; 9:399-402.
100. Prince D.S., Peterson D.D., Steiner R.M., Gottlieb J.E., Scott R., Israel H.L., Figueroa W.G., Fish J.E., *Infection with Mycobacterium avium complex in patients without predisposing conditions*, 1989, *N Engl J Med*; 321:863-868.
101. Reich J.M., Johnson R.E., *Mycobacterium avium complex pulmonary disease. Incidence, presentation, and response to therapy in a community setting*, 1991, *Am Rev Respir Dis*; 143:1381-1385.
102. Reich J.M., Johnson R.E., *Mycobacterium avium complex pulmonary disease presenting as an isolated lingual or middle lobe pattern. The Lady Windermere syndrome*, 1992, *Chest*; 101:1605-1609.
103. Reischl U., Melzl H., Kroppenstedt R.M., Miethke T., Naumann L., Mariottini A., Mazzarelli G., Tortoli E., *Mycobacterium monacense* sp. Nov, 2006, *Int J Syst Evol Microbiol*; 56:2575-2578.
104. Rodriguez-Diaz J.C., Lopez M., Ruiz M., Royo G., *In vitro activity of new fluoroquinolones and linezolid against nontuberculous mycobacteria*, 2003, *Int J Antimicrob Agents*; 21:585-588.
105. Rose H.D., Dorff G.J., Lauwasser M., Sheth N.K., *Pulmonary and disseminated Mycobacterium simiae infection in humans*, 1982, *Am Rev Respir Dis*; 126:1110-1113.
106. Rosenzweig D.Y., *Pulmonary mycobacterial infections due to Mycobacterium intracellulare-avium complex: clinical features and course in 100 consecutive cases*, 1979, *Chest*; 75:115-119.
107. Rynkiewicz D.L., Cage G.D., Butler W.R., Ampel N.M., *Clinical and microbiological assessment of Mycobacterium simiae isolates from a single laboratory in southern Arizona*, 1998, *Clin Infect Dis*; 26:625-630.
108. Salfinger M., Wallace R.J. Jr., *Susceptibility testing for nontuberculous mycobacteria: should it be performed?*, 1997, *Clin Microbiol News*; 19:68-71.
109. Saubolle M.A., Kiehn T.E., White M.H., Rudinsky M.F., Armstrong D., *Mycobacterium haemophilum: microbiology and expanding clinical and geographic spectra of disease in humans*, 1996, *Clin Microbiol Rev*; 9:435-447.
110. Schmitt T., Schnitzler N., Riehl J., Adam G., Sieberth P.G., Hasse G., *Successful treatment of pulmonary Mycobacterium xenopi infection in a natural killer cell-deficient patient with clarithromycin, rifabutin, and sparflaxacin*, 1999, *Clin Infect Dis*; 29:120-124.
111. Schröder K.H., Juhlin I., *Mycobacterium malmoense* sp. nov, 1977, *Int J Syst Bacteriol*; 27:241-246.
112. Shiraishi Y., Nakajima Y., Katsuragi N., Kurai M., Takahashi N., *Pneumonectomy for nontuberculous mycobacterial infections*, 2004, *Ann Thorac Surg*; 78:399-403.
113. Simor A.E., Salit I.E., Vellend H., *The role of Mycobacterium xenopi in human disease*, 1984, *Am Rev Respir Dis*; 129:435-438.
114. Sizaïre V., Nackers F., Comte E., Portaels F., *Mycobacterium ulcerans infection: control, diagnosis, and treatment*, 2006, *Lancet Infect Dis*; 6:288-296.

115. Skogberg K., Ruutu P., Tukiainen P., Valtonen VV. *Nontuberculous mycobacterial infection in HIV-negative patients receiving immunosuppressive therapy*, 1995, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 14:755-763.
116. Soini H., Eerola E., Viljanen M.K., *Genetic diversity among Mycobacterium avium complex AccuProbe-positive isolates*, 1996, *J Clin Microbiol*; 34:55-57.
117. Taillard C., Greub G., Weber R., Pfyffer G.E., Bodmer T., Zimmerli S., Frei R., Bassetti S., Rohner P., Piffaretti J.C., Bernasconi E., Bille J., Telenti A., Prod'Hom G., *Clinical implications of Mycobacterium kansasii species heterogeneity: Swiss National Survey*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:1240-1244.
118. Tessier M.H., Amoric J.C., Mechinaud F., Dubesset D., Litoux P., Stalder J.F., *Clarithromycin for atypical mycobacterial lymphadenitis in non-immunocompromised children [letter]*, 1994, *Lancet*; 344:1778.
119. Tjhie J.H., van Belle A.F., Dessens-Kroon M., van Soolingen D., *Misidentification and diagnostic delay caused by a false-positive Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test in an immunocompetent patient with a Mycobacterium celatum infection*, 2001, *J Clin Microbiol*; 39:2311-2312.
120. Tortoli E., *Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s*, 2003, *Clin Microbiol Rev*; 16:319-354.
121. Tortoli E., *Clinical features of infections caused by new nontuberculous mycobacteria, Part. I*, 2004, *Clin Microbiol News*; 26:89-95.
122. Tortoli E., *The new mycobacteria: an update*, 2006, *FEMS Immunol Med Microbiol*; 48:159-178.
123. Tortoli E., Böttger E.C., Fabio A., Falsen E., Gitti Z., Grottola A., Klenk H.P., Mannino R., Mariottini A., Messinò M., Pecorari M., Rumpianesi F., *Mycobacterium europaeum sp. nov., a scotochromogenic species related to the Mycobacterium simiae complex*, 2011, *Int J Syst Evol Microbiol*; 61:1606-1611.
124. Tortoli E., Pecorari M., Fabio G., Messinò M., Fabio A., *Commercial DNA-probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species*, 2009, *J Clin Microbiol*; 48:307-310.
125. Tortoli E., Piersimoni C., Bartoloni A., Burrini C., Callegaro M.P., Caroli G., Colombrita D., Goglio A., Mantella A., Passerini Tosi C., Simonetti M.T., *Mycobacterium malmoense in Italy: the modern Norman invasion?*, 1997, *Eur J Epidemiol*; 13:341-346.
126. Tortoli E., Piersimoni C., Kirschner P., Bartoloni A., Burrini C., Lacchini C., Mantella A., Muzzi G., Passerini Tosi C., Penati V., Scarparo C., Simonetti M.T., Böttger E.C., *Characterization of mycobacterial isolates phylogenetically related to, but different from, Mycobacterium simiae*, 1997, *J Clin Microbiol*; 35:697-702.
127. Tortoli E., Rindi L., Bartoloni A., Garzelli C., Manfrin V., Mantella A., Piccoli P., Scarparo C., *Isolation of a novel sequevar of Mycobacterium flavescens from the synovial fluid of an AIDS patient*, 2004, *Clin Microbiol Infect*; 10:1017-1019.
128. Tortoli E., Rindi L., Garcia M.J., Chiaradonna P., Dei R., Garzelli C., Kroppenstedt R.M., Lari N., Mattei R., Mariottini A., Mazzarelli G., Murcia M.I., Nanetti A., Piccoli P., Scarparo C., *Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the Mycobacterium avium complex, to species rank as Mycobacterium chimaera sp. nov.*, 2004, *Int J Syst Evol Microbiol*; 54:1277-1285.
129. Tortoli E., Simonetti M.T., *Radiometric susceptibility testing of Mycobacterium xenopi*, 1995, *J Chemother*; 7:114-117.

130. Tortoli E., Simonetti M.T., Lacchini C., Penati V., Urbano P., *Tentative evidence of AIDS-associated biotype of Mycobacterium kansasii*, 1994, *J Clin Microbiol*; 32:1779-1782.
131. Valero G., Peters J., Jorgensen J.H., Graybill J.R., *Clinical isolates of Mycobacterium simiae in San Antonio, Texas: An 11-years review*, 1995, *Am J Respir Crit Care Med*; 152:1555-1557.
132. van Ingen J., Boeree M.J., Koesters K., Wieland A., Tortoli E., Dekhuijzen P.N.R., van Soolingen D., *Proposal to elevate Mycobacterium avium complex sequevar MAC-Q to Mycobacterium vulneris sp. Nov.*, 2009, *Int J Syst Evol Microbiol*; 59:2277-2282.
133. Vejgaard T.B., Haahr V., Peterslund N.A., *Atypical mycobacteria. Disseminated infections in patients with hematologic diseases*, 1997, *Ugeskr Laeg*; 159:5362-5367.
134. Vemulapalli R.K., Cantey J.R., Steed L.L., Knapp T.L., Thielman N.M., *Emergence of resistance to clarithromycin during treatment of disseminated cutaneous Mycobacterium chelonae infection: case report and literature review*, 2001, *J Infect*; 43:163-168.
135. Viljanen M.K., Olkkonen L., Katila M.L., *Conventional identification characteristics, mycolate and fatty acid composition, and clinical significance of MAIX AccuProbe-positive isolates of Mycobacterium avium complex*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:1376-1378.
136. WHO, *Buruli ulcer: Mycobacterium ulcerans infection*, Geneva, Switzerland, WHO, 2000.
137. WHO, *Buruli ulcer disease (Mycobacterium ulcerans infection)*, Geneva, Switzerland, WHO, 2007.
138. Wallace R.J. Jr., Brown B.A., Griffith D.E., *Nosocomial outbreaks pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria*, 1998, *Ann Rev Microbiol*; 52:453-490.
139. Wallace R.J. Jr., Brown-Elliott B.A., Hall L., Roberts G., Wilson R.W., Mann L.B., Crist C.J., Chiu S.H., Dunlap R., Garcia M.J., Bagwell J.T., Jost K.C. Jr., *Clinical and laboratory features of Mycobacterium mageritense*, 2002, *J Clin Microbiol*; 40:2930-2935.
140. Wallace R.J. Jr., Nash D.R., Tsukamura M., Blacklock Z.M., Silcox V.A., *Human disease due to Mycobacterium smegmatis*, 1988, *J Infect Dis*; 158:52-59.
141. Wansbrough-Jones M., Phillips R., *Buruli ulcer: emerging from the obscurity*, 2006, *Lancet*; 367:1849-1858.
142. Wayne L.G., Sramek H.A., *Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases*, 1992, *Clin Microbiol Rev*; 5:1-25.
143. Weinstock D.M., Feinstein M.B., Sepkowitz K.A., Jakubowski A., *High rates of infection and colonization by nontuberculous mycobacteria after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*, 2003, *Bone Marrow Transplant*; 31:1015-1021.
144. Wickremasinghe M., Ozerovitch L.J., Davies G., Woodhouse T., Chadwick M.V., Abdallah S., Shah P., Wilson R., *Non-tuberculous mycobacteria in patients with bronchiectasis*, 2005, *Thorax*; 60:1045-1051.
145. Wittram C., Weisbrod G.L., *Mycobacterium avium complex lung disease in immunocompetent patients: radiography- CT correlation*, 2002, *Br J Radiol*; 75:340-344.
146. Wolfe J.M., Moore D.F., *Isolation of Mycobacterium thermoresistibile following augmentation mammoplasty*, 1992, *J Clin Microbiol*; 30:1036-1038.
147. Wolinsky E., *Nontuberculous mycobacteria and associated diseases*, 1979, *Am Rev Respir Dis*; 119:107-159.

148. Wolinsky E., Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long term follow-up, 1995, Clin Infect Dis; 20:954-963.
149. Woods G.L., Washington J.A. II, Mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis: review of microbiological and clinical aspects, 1987, Rev Infect Dis ; 9:275-294.
150. Yakrus M.A., Hernandez S.M., Floyd M.M., Sikes D., Butler W.R., Metchock B., Comparison of methods for Identification of Mycobacterium abscessus and M. chelonae isolates, 2001, J Clin Microbiol; 39:4103-4110.
151. Yuen K., Fam A.G., Simor A., Mycobacterium xenopi arthritis, 1998, J Rheumatol; 25:1016-1018.

Capitolo 5

RACCOLTA, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Claudio Piersimoni

5. RACCOLTA, CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI

La diagnosi microbiologica di tubercolosi o di micobatteriosi richiede l'isolamento di micobatteri dal campione biologico.

La finalità delle indagini micobatterologiche è quella di rilevare, nei campioni inviati dal clinico, la presenza di micobatteri, di identificarli e di determinarne, se opportuno, la sensibilità ai farmaci antimicobatterici.

5.1. SELEZIONE DEI PAZIENTI

5.1.1. RESA DIAGNOSTICA E APPROPRIATEZZA

La resa diagnostica dei test microbiologici dipende in larga misura dalla probabilità pre-test, ovvero dalla probabilità che il paziente in esame abbia realmente un'infezione dovuta al microrganismo oggetto della ricerca.

Perché la probabilità pre-test di una malattia da micobatteri sia sufficientemente elevata è necessario che:

- in caso di localizzazione polmonare, siano presenti:
 - sintomi tipici (tosse, febbre e sudorazioni notturne di durata superiore alle 3 settimane, accompagnate o meno da emottisi) oppure sintomi compatibili (espettorazione, calo ponderale);
 - associazione con quadri radiologici del torace caratteristici (lesioni cavitarie o nodulari, infiltrati alveolari o interstiziali localizzati prevalentemente ai lobi superiori o al segmento apicale del lobo inferiore), con quadri radiologici compatibili (adenopatia ilare, addensamenti simil-pneumonitici, atelettasia, versamento pleurico) (14, 40, 41, 43) oppure con il rilevamento di noduli centrolobulari con aspetto di "albero in fiore" all'esame TAC del torace (34);
- in caso di localizzazione extrapolmonare, siano presenti:
 - segni e sintomi localizzati associati a diagnostica per immagini compatibile con infezione da micobatteri (15, 22, 24).

Importanti eccezioni a quanto detto sopra riguardano:

- i pazienti gravemente immunodepressi (in particolare HIV-positivi), che possono presentare gravi forme polmonari, con microscopia positiva, anche in assenza di lesioni radiologiche (35);
- i pazienti pediatrici (<10 anni di età), nei quali si può avere scarsa sintomatologia clinica associata a opacità polmonari e adenopatia ilare (42, 51).

In ogni caso il materiale da inviare in laboratorio deve essere prelevato dal distretto corporeo sede della sospetta infezione, anche nel caso in cui sia necessario adottare procedure invasive (10, 33) (tab. 1).

L'attendibilità dei risultati dipende dalle modalità con cui i campioni sono stati raccolti, trasportati e conservati (10, 27). È compito del laboratorio di micobatterologia fornire istruzioni operative per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni.

Tab. I - INDAGINI DIAGNOSTICHE RACCOMANDATE NEL CASO DI SOSPETTA TUBERCOLOSI EXTRAPOLMONARE (33).

Sede di infezione	Segni clinici	Diagnostica per immagini	Biopsia	Coltura
Linfonodi	Linfoadenomegalia	Ecografia	Linfonodo	Biopsia, agoaspirato
Pleura	Pleurite essudativa	Rx standard, tomografia computerizzata (CT)	Pleura	Biopsia, escreato, liquido pleurico
Ossa/articolazioni	Interessamento delle articolazioni portanti (colonna vertebrale, anca e ginocchio)	Rx standard, tomografia computerizzata (CT), risonanza magnetica nucleare (RMN)	Sede di lesione	Biopsia, liquido articolare
Tratto gastrointestinale	Dolore addominale, sintomi di ostruzione intestinale	Ecografia, tomografia computerizzata (CT) dell'addome, endoscopia	Sede di lesione	Biopsia, liquido ascitico
Tratto genito-urinario	Segni e sintomi locali	Urografia, ecografia	Sede di lesione	Urine del mattino, biopsia, curettage dell'endometrio
Disseminata	Interessamento di 2 o più sedi non contigue, miliare	Tomografia computerizzata (CT) del torace ad alta risoluzione, ecografia addominale	Polmone, fegato, midollo osseo	Lavaggio bronchiale, biopsia del fegato, midollo osseo, sangue
Sistema nervoso centrale	Meningite, sintomi neurologici	Tomografia computerizzata (CT), risonanza magnetica nucleare (RMN) dell'encefalo	Tubercoloma	Biopsia, liquor
Cute	Ulcere cutanee, segni e sintomi locali		Sede di lesione	Biopsia, materiale necrotico purulento
Pericardio	Pericardite essudativa	Ecocardiogramma	Pericardio	Biopsia, liquido pericardico

5.2. RACCOLTA DEI CAMPIONI

5.2.1. GENERALITÀ

Tutti i materiali biologici devono essere considerati come potenzialmente infetti.

L'induzione dell'espettorato e le manovre broncoscopiche possono provocare emissione nell'ambiente di materiale infetto; devono quindi essere effettuate in locali idonei e il personale deve usare opportuni dispositivi di protezione individuale quali, ad esempio, maschera, guanti, camice.

La raccolta del materiale deve essere effettuata:

- prima dell'inizio della terapia antibiotica (10, 27); è tuttavia possibile inviare campioni successivi per il follow-up del paziente in terapia;
- in modo sterile, per evitare contaminazioni;
- in quantità adeguata, per evitare falsi negativi;
- in un numero adeguato di campioni, per evitare falsi negativi;
- evitando, ove possibile, l'uso di tamponi;
- utilizzando contenitori monouso sterili, con tappo a vite;
- senza l'aggiunta di conservanti o fissativi;
- facendo attenzione a non contaminare la superficie esterna del contenitore con il materiale biologico.

Il contenitore deve essere contrassegnato con un'etichetta indicante i dati anagrafici del paziente, il tipo di materiale, la sede di prelievo, la data e l'ora di raccolta; ad esso deve essere allegato, separatamente, il modulo di richiesta compilato in ogni sua parte.

Le indicazioni sulla modalità di raccolta dei micobatteri sono riportate nella tabella 2.

5.2.2. SELEZIONE DEI CAMPIONI E MODALITÀ DI RACCOLTA

5.2.2.1. MATERIALI PROVENIENTI DALLE VIE RESPIRATORIE

La localizzazione di gran lunga più frequente delle infezioni micobatteriche è quella polmonare, pertanto la maggioranza dei campioni è rappresentata da materiale di origine respiratoria raccolto con diverse modalità.

Espettorato

Il campione deve essere raccolto di primo mattino (10, 27, 48); l'utilizzo di campioni spot, raccolti cioè in momenti successivi della giornata, riduce sensibilmente la resa diagnostica (45). Prima della raccolta occorre rimuovere eventuali protesi dentarie ed effettuare un accurato risciacquo del cavo orale con acqua. L'inserimento, tra guance e gengive, di cilindretti assorbenti può essere utile per bloccare la secrezione salivare.

Al fine di ottenere un campione adeguato per qualità e quantità è preferibile che il paziente sia assistito da personale qualificato durante la raccolta (1, 6).

L'espettorato deve provenire dalle basse vie aeree, espulso con un colpo di tosse. Il campione non deve essere costituito da saliva o contaminato da secrezioni naso-faringee e la quantità non deve essere inferiore a 5 mL (49). La raccolta nello stesso contenitore di escreti prelevati in momenti diversi non è accettabile. Sebbene la maggior parte delle linee guida raccomandi l'invio in laboratorio di 3 campioni raccolti in giorni diversi possibilmente consecutivi, alcuni studi volti a quantificare la resa diagnostica di ciascuno dei 3 campioni hanno evidenziato che il terzo campione incide per una quota che oscilla fra il 2% e il 5%. È stato dimostrato, inoltre, che la raccolta di 3 campioni in giorni differenziati non è più efficace di quella composta da 2 campioni raccolti, al mattino, nel medesimo giorno (13, 30).

Espettorato indotto

Se il paziente ha difficoltà nell'espettorare spontaneamente o, comunque, se la raccolta dell'espettorato è problematica, si può ricorrere all'induzione facendo inspirare al paziente, lentamente e

Tab. 2 - SPECIFICHE PER LA RACCOLTA DEI CAMPIONI BIOLOGICI PER RICERCA DEI MICOBATTERI.

Tipo di campione	Requisiti	Istruzioni speciali	Campioni non idonei
Aspirato gastrico	≥5-10 mL raccolto al mattino, dopo almeno 8 ore di digiuno, per 3 giorni consecutivi	Neutralizzare (pH 7) con carbonato di sodio	Campioni non neutralizzati
Broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare, spazzolatura bronchiale, aspirato trans-tracheale	≥3 mL	Disinfettare accuratamente il broncoscopio	
Espectorato	5-10 mL raccolto al mattino da espettorazione profonda, per 3 giorni consecutivi	Istruire il paziente su come espettorare correttamente	Saliva; pool di campioni
Espectorato indotto	5-10 mL raccolto al mattino, per 3 giorni consecutivi	Specificare chiaramente nella richiesta, e sul contenitore, che si tratta di espectorato indotto	
Feci	Almeno 1 g in contenitore senza conservanti	Per la diagnosi di tubercolosi intestinale ricorrere al prelievo bioptico	
Linfonodo	Linfonodo o porzione di esso in contenitore sterile, senza fissativi o conservanti	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in formalina o altri fissativi; campioni inclusi in paraffina
Liquidi cavitari: pleurico, pericardico, peritoneale ecc.	10-15 mL in provetta sterile (con citrato trisodico)	Per la diagnosi di pleurite tubercolare sono più indicati biopsia pleurica ed espectorato	
Liquor	≥2 mL		
Materiale da lesioni cutanee	La massima quantità possibile	Utilizzare tamponi senza terreno di trasporto agarizzato solo se non è possibile eseguire il prelievo con siringa o biopsia	Tamponi con terreno di trasporto agarizzato
Materiali necrotico-ascessuali	La quantità massima possibile in siringa con copriago	Se non è possibile usare la siringa, utilizzare più tamponi senza terreno di trasporto agarizzato e inserirli in un contenitore sterile con una piccola quantità di fisiologica sterile	
Midollo emopoietico	La massima quantità possibile, direttamente nel flacone da emocoltura, o in provetta con eparina o in provetta Isolator		Campione coagulato; campione in provetta con EDTA

SEGUE →

Tipo di campione	Requisiti	Istruzioni speciali	Campioni non idonei
Prelievi tessutali e biopsie	Almeno 1 g di tessuto in contenitore senza fissativi o conservanti	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in formalina o altri fissativi; campioni inclusi in paraffina
Sangue mestruale	Alcuni mL, raccolti al 2°-3° giorno del flusso mestruale, in provetta con eparina	Preferibile eseguire <i>curettagge</i> dell'endometrio	Sangue coagulato
Sangue periferico	Direttamente nel flacone da emocoltura, o in provetta con eparina o in provetta Isolator	2 o 3 campioni, prelevati a distanza di 30 minuti uno dall'altro, indipendentemente dall'andamento febbrile	Sangue coagulato; sangue in provetta con EDTA
Urine	La prima urina del mattino, ottenuta anche mediante cateterizzazione (almeno 50 mL), per 3 giorni consecutivi	Il mitto intermedio è sconsigliato	Urine delle 24 ore; urine da sacca; volumi inferiori a 50 mL

profondamente per un periodo di 15-20 minuti, un aerosol di soluzione salina ipertonica generato sterilmente da un nebulizzatore ultrasonico (5, 10, 11, 26, 44). Per evitare rischi di trasmissione nosocomiale, l'induzione aerosolica deve essere eseguita in condizioni di isolamento respiratorio (10). La procedura per la raccolta dell'espettorato indotto è ben tollerata da tutti i pazienti, bambini inclusi (53).

Poiché l'aspetto dell'espettorato indotto è quasi sempre salivare, si raccomanda di segnalare al laboratorio la natura del materiale, per evitare che possa essere considerato non idoneo.

Nonostante questa modalità di raccolta sia poco utilizzata nella pratica clinica in Italia, numerosi studi hanno dimostrato che ha una resa diagnostica superiore all'aspirato gastrico (10, 17, 26, 52, 53) e pari, o addirittura superiore, a quella dei materiali raccolti mediante broncoscopia (1-3, 7, 9, 11, 17). L'escreato indotto risulta vantaggioso rispetto alla broncoscopia anche dal punto di vista del rapporto costo/beneficio (2, 3, 14, 31).

Broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare, aspirato trans-tracheale

I campioni prelevati tramite broncoscopia sono diventati oggi i materiali respiratori più frequentemente utilizzati dopo gli espettorati.

La facilità del prelievo ha portato a un aumento della richiesta di colture per micobatteri su tali campioni anche in pazienti con quadri clinici e radiologici scarsamente compatibili con tale patologia. Russell, già nel 1986, aveva dimostrato che la ricerca routinaria dei micobatteri è assolutamente inutile e che anzi può dare luogo a diagnosi errate nel caso di isolamento di micobatteri non tubercolari. Tale ricerca è giustificata solo in pazienti con lesioni cavitari e infiltrati polmonari e nei soggetti immunodepressi in presenza o in assenza di anomalie radiologiche del polmone, nel caso in cui la ricerca su escreato abbia dato esito negativo (38).

La resa diagnostica del broncolavaggio è superiore a quella dell'aspirato gastrico (20, 36), ma uguale, o lievemente inferiore, a quella dell'escreato e dell'escreato indotto (2, 3, 9, 17). Inoltre, i campioni di broncoaspirato o lavaggio bronco-alveolare (BAL) si sono dimostrati nettamente

superiori a quelli ottenuti per spazzolatura bronchiale, tanto che questi ultimi sono praticamente scomparsi dalle richieste diagnostiche (38). Una buona resa diagnostica caratterizza i campioni di escreato raccolti subito dopo l'esecuzione della broncoscopia (10).

Il volume del prelievo di broncoaspirato e lavaggio bronco-alveolare non deve essere inferiore a 3 mL (12, 48). I broncoscopi devono essere disinfettati accuratamente per evitare cross-contaminazioni.

Aspirato gastrico e string test

Questo tipo di campione, riservato ai casi in cui il paziente non sia in grado di espettorare spontaneamente o dopo induzione aerosolica, è il più comunemente impiegato nei bambini.

Il lavaggio gastrico va eseguito al mattino, quando il paziente è a digiuno da almeno otto ore, utilizzando 25-50 mL di acqua distillata sterile. La procedura, eseguita in 3 giorni consecutivi, richiede l'ospedalizzazione del paziente e la disponibilità di ambienti idonei all'isolamento respiratorio ed è controindicata in bambini affetti da diatesi emorragiche o con basso numero di piastrine (10). Il pH del campione deve essere neutralizzato entro un'ora dal prelievo, aggiungendo all'aspirato 100 mg di carbonato di sodio.

Lo *string test* consiste nel far inghiottire al paziente una capsula di gel attaccata a un filo di nylon (HDC Corporation, Ca, USA). Nello stomaco, la capsula di gel viene dissolta dal succo gastrico consentendo al filo posto al suo interno di aderire alle secrezioni gastriche. Dopo 4 ore il filo viene recuperato e lavato con 1-2 mL di soluzione fisiologica (4, 13, 47). Lo *string test*, sviluppato originariamente per la ricerca di batteri enteropatogeni, non è invasivo e si è dimostrato più efficace dell'escreato indotto in adulti HIV-positivi con tubercolosi polmonare e in bambini di età superiore ai 4 anni (13, 47).

5.2.2.2. MATERIALI DI ORIGINE NON RESPIRATORIA

Liquidi cavitari

I materiali contenuti in raccolte chiuse quali liquido pleurico, pericardico, sinoviale, ascitico e peritoneale devono essere prelevati usando tecniche di aspirazione o procedure chirurgiche più complesse (10, 27).

Devono essere usate provette con anticoagulante, poiché il liquido prodotto nel corso di una reazione infiammatoria (essudato) può contenere fibrinogeno. Dato che l'EDTA è tossico per i micobatteri e l'eparina può inibire la Taq polimerasi, l'anticoagulante di riferimento è il citrato trisodico. Il volume consigliato è di 15 mL (12, 48).

L'espettorato indotto si è dimostrato più efficace del liquido pleurico e inferiore alla sola biopsia pleurica per la diagnosi microbiologica di pleurite tubercolare (5, 16). Nei pazienti immunocompetenti con pleurite tubercolare diagnosticata istologicamente, la coltura del liquido pleurico è positiva in meno del 40% dei casi, mentre tale percentuale risulta molto più elevata nel caso in cui il campione venga prelevato da un empiema pleurico (46). Infatti la pleurite è prevalentemente reattiva nel primo caso, mentre è sicuramente legata alla presenza dell'agente eziologico nel secondo. Stando così le cose, la coltura del liquido pleurico dovrebbe essere richiesta basandosi sulla presenza di fattori predittivi di malattia tubercolare, quali un forte sospetto clinico, una pleurite meta-pneumonica o un empiema pleurico (5).

Liquido cefalo-rachidiano (liquor)

Occorre prelevare il massimo volume possibile. Per un esame adeguato sono necessari non meno di 2-3 mL (12, 48). Nel caso in cui non si possa disporre della quantità indicata, i test debbono essere eseguiti a partire da quello di maggiore sensibilità indipendentemente dalla richiesta del clinico. Si eseguirà per prima la coltura sul solo terreno liquido (il solido non è sufficientemente sensibile), poi l'amplificazione genica e, per ultima, la microscopia. Nel caso in cui si disponga di un quantitativo di 10 mL o più, il campione può essere ultracentrifugato risospendendo il sedimento nel volume necessario, oppure può essere ultrafiltrato attraverso membrana (0,45 µ). Dopo la filtrazione, la membrana viene rimossa asepticamente e posta in 2 mL di soluzione fisiologica per 2 ore, dopo di che il liquido può essere utilizzato per tutte le procedure microbiologiche (29).

Materiali necrotico-purulenti

Fatta eccezione per i casi di drenaggio spontaneo (tragitti fistolosi da linfonodi colliquati o apertura all'esterno di raccolte ascessuali), i materiali necrotico-purulenti vengono raccolti tramite agoaspirato transcutaneo (50). La tecnica dell'agoaspirato può essere applicata anche a linfonodi o a masse localizzate in sede mediastinica, endoaddominale e/o retroperitoneale, eseguendo il prelievo in corso di broncoscopia o di endoscopia dell'apparato digerente (7, 8).

L'uso del tampone deve essere limitato ai casi in cui il prelievo con siringa non sia possibile; in tali casi si stempera il materiale prelevato dalla lesione in 2-3 mL di soluzione fisiologica sterile, ripetendo l'operazione più volte fino ad ottenere un campione piuttosto denso. I materiali raccolti mediante tamponi posti in terreno di trasporto agarizzato non sono idonei (12, 48).

Urine

Dopo pulizia accurata dei genitali esterni, raccogliere almeno 50 mL di urina includendo anche il primo mitto (12, 48); la modalità di raccolta mediante mitto intermedio è sconsigliata. È raccomandato l'invio di 3 campioni della prima urina del mattino raccolti in giorni consecutivi. In alternativa il prelievo può essere effettuato mediante cateterizzazione o con puntura sovrapubica. La raccolta delle 24 ore o le urine da sacca non sono utilizzabili a causa della frequenza con cui si verificano contaminazioni.

Pazienti sottoposti ad antibioticoterapia ad ampio spettro possono eliminare con le urine sostanze capaci di inibire o ritardare la crescita dei micobatteri (in particolare i chinoloni) (10).

La presenza di *Mycobacterium tuberculosis* nelle urine non necessariamente indica tubercolosi dell'apparato urinario. Infatti, *Mycobacterium tuberculosis* può essere isolato dalle urine anche in corso di tubercolosi polmonare con estese lesioni cavitari, di miliare o di tubercolosi generalizzata (pazienti HIV-positivi). Ciò che consente di correlare l'isolamento di *Mycobacterium tuberculosis* con la diagnosi clinica di tubercolosi urinaria è l'associazione, sempre presente, di piuria/ematuria e/o sintomatologia d'organo (23, 32). Sarebbe pertanto buona prassi eseguire la ricerca di micobatteri nelle urine solo nei casi di sospetta tubercolosi urinaria (presenza di piuria e/o ematuria), preferendo negli altri casi i campioni respiratori o il sangue.

Feci

Occorre raccogliere una piccola quantità di feci (pari al volume di una noce) e porla in un contenitore sterile, prestando attenzione a non contaminarlo esternamente. Non è possibile utilizzare tamponi rettali.

La ricerca dei micobatteri su campioni di feci non è raccomandata, può essere tuttavia utilizzata per la diagnosi di tubercolosi polmonare in pazienti anziani che, non riuscendo ad espettorare, deglutiscono l'escreato; essa dovrebbe essere preventivamente concordata con il clinico (12, 48).

Per la diagnosi di tubercolosi dell'apparato gastrointestinale si raccomanda il ricorso al prelievo biotico (7, 19).

Biopsie o prelievi operatori

I tessuti devono essere posti in contenitori sterili senza conservanti o fissativi; in nessun caso i frammenti devono essere avvolti in garza. Occorre aggiungere soluzione salina sterile in quantità sufficiente da evitare l'essiccamento dei campioni di piccole dimensioni. Poiché si tratta di campioni ottenuti tramite procedure invasive e che rivestono un ruolo diagnostico insostituibile, è necessario attivarsi per evitare, come spesso accade, che al momento del prelievo anche la parte da inviare alla microbiologia sia posta erroneamente in formalina, come quella destinata all'anatomia patologica.

Nel sospetto di micobatteriosi disseminata e in assenza di segni di localizzazione si può eseguire una biopsia epatica (10).

Nel caso di sospetta tubercolosi genitale femminile il materiale di elezione è l'endometrio ottenuto mediante raschiamento (25).

Materiale da lesioni cutanee

Si può utilizzare per la raccolta un tampone solo se non è possibile eseguire biopsia o agoaspirato.

Nelle ulcere si deve raccogliere il campione alla periferia della lesione.

I materiali raccolti mediante tamponi con terreno di trasporto agarizzato non sono idonei (12, 48).

Sangue e midollo emopoietico

Sangue e midollo osseo costituiscono i materiali d'elezione per la diagnosi delle forme disseminate (18, 19, 28, 37). Si devono inviare in laboratorio non meno di due e non più di tre campioni raccolti a distanza di mezz'ora l'uno dall'altro, indipendentemente dall'andamento febbrile.

Per il prelievo di sangue periferico occorre disinfettare la cute con le stesse modalità delle emocolture tradizionali.

È possibile effettuare il prelievo direttamente nel flacone di coltura nel caso in cui si impieghino sistemi che prevedono flaconi specifici (BacT/ALERT MB, bioMérieux; BACTEC Myco/F Lytic, Becton Dickinson).

Il prelievo con provette Isolator (Oxoid) deve essere effettuato in tutti gli altri casi, miscelando per inversione le provette immediatamente dopo il prelievo. Il sistema Isolator si basa sulla "lisi-centrifugazione" e permette di seminare i campioni di sangue, o di midollo emopoietico, come un qualsiasi altro materiale sterile (12, 27). Nel paziente adulto si devono raccogliere, nella provetta Isolator 10, 10 mL di sangue; per i pazienti pediatrici sono invece sufficienti 1,5 mL nella provetta Isolator 1.5. Non possono essere utilizzate provette con EDTA, dato che può inibire la crescita dei micobatteri.

5.1.3. CONSERVAZIONE E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Il trasporto dei campioni deve rispettare tempi e condizioni che permettano di non alterare le caratteristiche microbiologiche del materiale biologico (10, 21, 39, 48).

L'invio in laboratorio deve essere effettuato il più presto possibile, e se l'attesa si protrae oltre un'ora il campione deve essere conservato a 4 °C; fanno eccezione le emocolture che devono es-

sere tenute a temperatura ambiente. Deve essere evitato il congelamento dei campioni perché può diminuire la carica dei micobatteri vitali.

Per la spedizione si devono applicare le modalità previste dalla Circolare del Ministero della Sanità N. 16 del 20/07/1994.

5.3. IDONEITÀ DEI CAMPIONI

I campioni raccolti con modalità non corrette o pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere processati, segnalandone al clinico i motivi. Tali campioni devono essere tuttavia conservati per almeno tre giorni per fornire al clinico l'opportunità di richiederne la processazione in via eccezionale in caso di impossibilità di raccogliere un campione adeguato. È buona norma tenere un registro scritto delle non-conformità e attivarsi per fornire adeguate e corrette istruzioni operative al personale clinico/infermieristico.

I principali criteri di non accettabilità dei campioni sono riportati nella tabella 2.

BIBLIOGRAFIA

1. Alisjahbana B., van Crevel R., Danusantoso H., Gartinah T., Soemantri E.S., Nelwan R.H.H., van der Meer JW., *Better patient instruction for sputum sampling can improve microscopic tuberculosis diagnosis*, 2005, *Int J Tuberc Lung Dis*; 9:814-817.
2. Al Zahrani K., Al Jahdali H., Poirier L., Rene P., Menzies D., *Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 2001, *Int J Tuberc Lung Dis*; 5:855-860.
3. Anderson C., Inhaber N., Menzies R.I., *Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis*, 1995, *Am J Respir Crit Care Med*; 152:1570-1574.
4. Bae W.H., Salas A., Brady M.F., Coronel J., Colombo C.G.L., Castro B., Gilman R.H., Moore D.A., *Reducing the string test intra-gastric downtime for detection of Mycobacterium tuberculosis*, 2008, *Int J Tuberc Lung Dis*; 12:1436-1440.
5. Barnes T.W., Olson E.J., Morgenthaler T.I., Edson R.S., Decker P.A., Ryu J.H., *Low yield of microbiologic studies on pleural fluid specimens*, 2005, *Chest*; 127: 916-921.
6. Bell D.J., Dacombe R., Graham S.M., Hicks A., Cohen D., Chikaonda T., French N., Molyneux M.E., Zijlstra E.E., Squire S.B., Gordon S.B., *Simple measures are effective as invasive techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in Malawi*, 2009, *Int J Tuberc Lung Dis*; 13:99-104.
7. Berzosa M., Tsukayama T., Davies S.F., Debol S.M., Cen Y.Y., Li R., Mallery S., *Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis*, 2010, *Int J Tuberc Lung Dis*; 14:578-584.
8. Bilaceroglu S., Günel Ö., Eris N., Cagirci U., Mehta A.C., *Transbronchial needle aspiration in diagnosing intrathoracic tuberculosis lymphadenitis*, 2004, *Chest*; 126:259-267.
9. Brown M., Varia H., Basset P., Davidson R.N., Wall R., Pasvol G., *Prospective study of sputum induction, gastric washing and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients who are unable to expectorate*, 2007, *Clin Infect Dis*; 44:1415-1420.
10. Bureau of Tuberculosis Control. *Tuberculosis. Clinical policies and protocols*, 2008, New York City Department of Health and Mental Hygiene. <http://www.nyc.gov/health/tb>.
11. Carr D.T., Karlson A.G., Silwell G.G., *A comparison of cultures of induced sputum and gastric washings in the diagnosis of tuberculosis*, 1967, *Mayo Clin Proc*; 42:23-25.
12. CLSI, *Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline*, 2008, CLSI, Forbes, BA.
13. Chow F., Espiritu N., Gilman R.H., Gutierrez R., Lopez S., Escombe A.R., Evans C.A.W., Moore D.A.J., *La cuerda dulce - a tolerability and acceptability study of a novel approach to specimen collection for diagnosis of paediatric pulmonary tuberculosis*, 2006, *BMC Infect Dis*; 6: 67.
14. Cohen R., Muzzaffar S., Capellan J., Azar H., Chinikamwala M., *The validity of classic symptoms and chest radiographic configuration in predicting pulmonary tuberculosis*, 1996, *Chest*; 109: 420-423.
15. Colmenero J.D., Jimènez-Mejías M.E., Reguera J.M., Palomino-Nicas J., Ruiz-Mesa J.D., Márquez-Rivas J., Lozano A., Pachón J., *Tuberculous vertebral osteomyelitis in the new millennium: still a diagnostic and therapeutic challenge*, 2004, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 23:477-483.

16. Conde M.B., Loivos A.C., Rezende V.M., Soares S.L., Mello F.C., Reingold A.L., Daley C.L., Kritski A.L., *Yield of sputum induction in the diagnosis of pleural tuberculosis*, 2003, *Am J Respir Crit Care Med*; 167:723-725.
17. Conde M.B., Soares S.L., Mello F.C., Rezende V.M., Almeida L.L., Reingold A.L., Daley C.L., Kritski A.L., *Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. Experience at an Acquired Immune Deficiency Syndrome Reference Center in Rio de Janeiro, Brazil*, 2000, *Am J Respir Crit Care Med*; 162:2238-2240.
18. Crump J.A., Reller L.B., *Two decades of disseminated tuberculosis at a university medical center: the expanding role of mycobacterial blood culture*, 2003, *Clin Infect Dis*; 37:1037-1043.
19. Damsker B., Bottone E.J., *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare from the intestinal tracts of patients with the acquired immunodeficiency syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis*, 1985, *J Infect Dis*; 151:179-181.
20. Dickson S.J., Brent A., Davidson N.R., Wall R., *Comparison of bronchoscopy and gastric washings in the investigation of smear-negative pulmonary tuberculosis*, 2003, *Clin Infect Dis*; 37:1649-1653.
21. Engbaek H.C., Weis-Bentzon M., *Transport of sputum specimens to a central tuberculosis laboratory. Evaluation of routine specimens from Greenland. 2. Experimental work with sputum specimens from Denmark*, 1964, *Acta Tuberc Scand*; 45:89-104.
22. Fee M.J., Oo M.M., Gabayan A.E., Radin D.R., Barnes P.F., *Abdominal tuberculosis in patients infected with the human immunodeficiency virus*, 1995, *Clin Infect Dis*; 20:938-944.
23. García-Rodríguez J.A., García Sanchez J.E., Muñoz Bellido J.L., Montes Martines I., Rodríguez Hernández J., Fernández Gorostarzu J., Urrutia Avisrorr M., *Genitourinary tuberculosis in Spain: review of 81 cases*, 1994, *Clin Infect Dis*; 18:557-561.
24. Jakubowski A., Elwood R.K., Enarson D.A., *Clinical features of abdominal tuberculosis*, 1988, *J Infect Dis*; 158:687-692.
25. Jindal U.N., *An algorithmic approach to female genital tuberculosis causing infertility*, 2006, *Int J Tuberc Lung Dis*; 10:1045-1050.
26. Jones F.L. Jr., *The relative efficacy of spontaneous sputa, aerosol-induced sputa, and gastric-aspirates in the bacteriologic diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 1966, *Dis Chest*; 50:403-408.
27. Kent P.T., Kubica G.P., *Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory*, 1985, US Department of Health and Human Services, Atlanta.
28. Kiehn T.E., Edwards F.F., Brannon P., Tsang A.Y., Maio M., Gold J.W.M., Whimbley E., Wong B., McClatchy J.K., Armstrong D., *Infections caused by Mycobacterium avium complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics*, 1985, *J Clin Microbiol*; 21:168-173.
29. Kumar P, Srivatsava M.V.P., Singh S., Prasad H.K., *Filtration of cerebrospinal fluid improves isolation of mycobacteria*, 2008, *J Clin Microbiol*; 46: 2824-2825.
30. Mase S.R., Ramsay A., Ng V., Hopewell P.C., Cunningham J., Urbanczik R., Perkins M.D., Aziz M.A., Pai M., *Yield of serial sputum specimen examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review*, 2007, *Int J Tuberc Lung Dis*; 11:485-495.

31. McWilliams T, Wells A.U., Harrison A.C., Lindstrom S., Cameron R.J., Foskin E., *Induced sputum and bronchoscopy in the diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 2002, Thorax; 57:1010-1014.
32. Mortier E., Pouchot J., Girard L., Boussougnant Y., Vinceneux P., *Assessment of urine analysis for the diagnosis of tuberculosis*, 1996, Brit Med J; 312:27-28.
33. National Institute for Health and Clinical Excellence, Tuberculosis, *Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*, 2006, Clinical Guideline 33. <http://www.nice.org.uk>.
34. Okada F., Ando Y., Yoshitake S., Ono A., Tanoue S., Matsumoto S., Wakisaka M., Maeda T., Mori H., *Clinical/pathological correlations in 553 patients with primary centrilobular findings on high-resolution CT scan of the thorax*, 2007, Chest; 132:1939-1948.
35. Oni T., Burke R., Tsekela R., Bangani N., Seldon R., Gideon H.P., Wood K., Wilkinson K.A., Ottenhoff T.H., Wilkinson R.J., *High prevalence of subclinical tuberculosis in HIV-1-infected persons without advanced immunodeficiency: implications for TB screening*, 2011, Thorax; 66:669-673.
36. Rizvi N., Rao N.A., Hussain M., *Yield of gastric lavage and bronchial wash in pulmonary tuberculosis*, 2000, Int J Tuberc Lung Dis; 4:147-151.
37. Rose P.C., Schaaf H.S., Marais B.J., Gie R.P., Stefan D.C., *Value of bone marrow biopsy in children with suspected disseminated mycobacterial disease*, 2011, Int J Tuberc Lung Dis; 15: 200-204.
38. Russell M.D., Torrington K.G., Tenhokder M., *A ten-year experience with fiberoptic bronchoscopy for mycobacterial isolation. Impact of the Bactec system*, 1986, Am Rev Respir Dis; 133: 1069-1071.
39. Smithwick R.W., Stratigos C.B., David H.L., *Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of Mycobacterium tuberculosis*, 1975, J Clin Microbiol; 1:411-413.
40. Solari L., Acuna-Villaorduna C., Soto A., Agapito J., Perez F., Samalvides S., Zegarra J., Diaz J., Gotuzzo E., van der Stuyft P., *A clinical prediction rule for pulmonary tuberculosis in emergency departments*, 2008, Int J Tuberc Lung Dis; 12:619-624.
41. Solari L., Acuna-Villaorduna C., Soto A., van der Stuyft P., *Evaluation of clinical prediction rules for respiratory isolation of patients with suspected pulmonary tuberculosis*, 2011, Int J Tuberc Lung Dis; 52: 595-603.
42. Swaminathan S., Rekha B., *Pediatric tuberculosis: global overview and challenges*, 2010, Clin Infect Dis; 50:S184-S194.
43. Tattevin P., Casalino E., Fleury L., Egmann G., Ruel M., Bouvet E., *The validity of medical history, callis symptoms, and chest radiographs in predicting pulmonary tuberculosis*, 1999, Chest; 115:1248-1253.
44. Toubes M.E., Blanco M., Barbeyto L., Gayoso P., Iglesias P., Castro-Paz A., Lamela J., *Comparison of two techniques of sputum induction in the diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 2005, Int J Tuberc Lung Dis; 9:56-60.
45. Urbanczik R., *Laboratory tests focusing on sputum*, 2010, Int J Tuberc Lung Dis; 14:1087-1093.
46. Valdés L., Alvarez D., San José E., Penela P., Valle J.M., Garcia-Pazos J.M., Suárez J., Pose A., *Tuberculous pleurisy*, 1998, Arch Intern Med; 158:2017-2021.
47. Vargas D., Garcia L., Gilman R.H., Evans C., Ticona E., Navincopa M., Luo R.F., Caviades L., Hong C., Escombe R., Moore D.A., *Diagnosis of sputum-scarce HIV-associated pulmonary tuberculosis in Lima, Peru*, 2005, Lancet; 365:150-152.

48. Wallis C.K., Specimen collection and transport, in: Isenberg H.D. Ed., *Clinical microbiology procedures handbook*. 3.2.1-3.2.61, 1992, American Society for Microbiology, Washington.
49. Warren J.R., Bhattacharya M., De Almeida K.N.F., Trakas K., Peterson L.R., *A minimum 5.0 mL of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for Mycobacterium tuberculosis*, 2000, *Am J Respir Crit Care Med*; 161:1559-1562.
50. Wilson D., Nachega J.B., Chaisson R.E., Maartens G., *Diagnostic yield of peripheral lymph node needle-core biopsies in HIV-infected adults with suspected smear-negative tuberculosis*, 2005, *Int J Tuberc Lung Dis*; 9:220-222.
51. Wong K.S., Huang Y.C., Lai S.H., Chiu C.Y., Huang Y.H., Lin T.Y., *Validity of symptoms and radiographic features in predicting positive acid-fast bacilli smears in adolescents with tuberculosis*, 2010, *Int J Tuberc Lung Dis*; 14:155-159.
52. Zar H.J., Hanslo D., Apolles P., Swingler G., Hussey G., *Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study*, 2005, *Lancet*; 365:130-134.
53. Zar H.J., Tannenbaum E., Apolles P., Roux P., Hanslo D., Hussey G., *Sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in infants and young children in an urban setting in South Africa*, 2000, *Arch Dis Child*; 82:305-308.

Capitolo 6

ESAME MICROSCOPICO

Gian Lorenzo Molinari

6. ESAME MICROSCOPICO

L'esame microscopico è il test diagnostico più rapido ed economico utilizzato in micobatterio-
logia. Rappresenta un importante aiuto per il clinico, che non deve attendere i tempi relativamente
lungi dell'esame colturale per l'individuazione dei soggetti che necessitano di isolamento e per la
dimissione dei pazienti in terapia non più contagiosi. I limiti principali del metodo sono costituiti
dalla scarsa sensibilità, risulta infatti positivo solo in presenza di un numero elevato di micobatteri
nel campione, e la scarsa specificità (7, 8), dal momento che le proprietà tintoriali dei micobatteri
sono comuni anche ad altri microrganismi. Ne consegue che all'esame microscopico deve sempre
essere abbinato l'esame colturale.

I micobatteri sono microrganismi difficilmente colorabili a causa della presenza di un'elevata
quantità di lipidi, fra cui gli acidi micolici, nella parete batterica. Questa caratteristica fa sì che,
diversamente dalla grande maggioranza dei batteri, i micobatteri si colorino poco o per nulla con
la colorazione di Gram, mentre sono in grado di legare stabilmente alcuni coloranti in soluzione
acquosa di fenolo, che riescono poi a trattenere anche se sottoposti a un trattamento di decolora-
zione molto energico eseguito con una miscela di acido forte e alcol. Tale proprietà è conosciuta
come alcol-acido-resistenza. Il fenolo avrebbe la funzione di facilitare la penetrazione del colorante
nella parete.

Come coloranti primari possono essere impiegati tanto la carbolfucsina quanto i fluorocromi
(auramina e rodamina). Il successivo impiego di un secondo colorante (secondario) di contrasto,
che controcolora tutto il preparato ad eccezione dei bacilli alcol-acido-resistenti, ne permette una
più agevole individuazione.

6.1. PREPARAZIONE DELLO STRISCIO

Il campione:

I campioni sui quali normalmente si esegue la colorazione per la ricerca di bacilli alcol-acido-
resistenti sono o materiali biologici provenienti da pazienti con sospetta infezione micobatterica
oppure colture con presenza di crescita.

È possibile effettuare la ricerca microscopica di micobatteri in qualsiasi materiale biologico con
la sola eccezione del sangue, in cui l'eventuale carica batterica è solitamente inferiore alla soglia di
sensibilità del metodo.

Sui materiali biologici l'esame microscopico eseguito direttamente, cioè senza concentrazione
mediante centrifugazione, è sconsigliato, dal momento che ne verrebbe ridotta ulteriormente la già
bassa sensibilità.

Per quanto riguarda i preparati da coltura, che contengono alte cariche di microrganismi, i ve-
trini possono essere allestiti direttamente, non essendo necessaria la concentrazione; per essi deve
essere utilizzata la colorazione a base di carbolfucsina che evidenzia in maniera ottimale le caratte-
ristiche morfologiche dei micobatteri (1).

Procedimento:

Tutte le procedure vanno eseguite in cappa di sicurezza Biohazard di classe II (I, 10). È bene inoltre ricordare che la fissazione non garantisce che tutti i micobatteri non siano più vitali.

Per l'esecuzione dello striscio:

- utilizzare vetrini nuovi e ben sgrassati, opportunamente contrassegnati con l'identificativo del campione;
- trasferire una porzione del campione sul vetrino utilizzando un'ansa o una pipetta. Distribuire il materiale su una superficie di approssimativamente 1,5x2 cm, facendo attenzione che il preparato non risulti eccessivamente spesso o sottile:
 - per i campioni concentrati (tramite centrifugazione per 15 minuti a 3000 x g oppure mediante citocentrifugazione) utilizzare una o due gocce di sedimento;
 - per i campioni non concentrati prelevare una ansata di materiale necrotico-purulento;
 - per i campioni di liquido cefalo-rachidiano (liquor), aspirare 0,2 mL di *pellet*, depositarlo al centro del vetrino e lasciare asciugare all'aria. Ripetere questa operazione quattro volte, ponendo la nuova goccia sulla precedente una volta che questa si è asciugata (1). Può essere utile delimitare sul vetrino, con matita vetrografica, il luogo del deposito per facilitarne il ritrovamento al momento della lettura;
- lasciare asciugare all'aria;
- fissare i vetrini utilizzando uno dei seguenti metodi:
 - porli su una piastra riscaldante (65°-75 °C) per almeno due ore;
 - passarli per non più di 3-4 volte alla fiamma ossidante (blu o incolore) di un becco Bunsen;
 - immergerli in metanolo assoluto per almeno un minuto (è da tenere presente che l'utilizzo della stessa vaschetta per più vetrini può essere causa di contaminazioni crociate).

6.2. METODI DI COLORAZIONE

Per la ricerca dei bacilli alcol-acido-resistenti possono essere utilizzati, come coloranti primari, la carbofucsina (colorazioni di Ziehl-Neelsen e di Kinyoun) oppure i fluorocromi (colorazione con auramina e sue varianti). La metodica di Kinyoun è una variante dalla metodica di Ziehl-Neelsen in cui viene utilizzata, come colorante primario, carbofucsina, modificata in modo che non sia necessario il riscaldamento del vetrino che comporta lo sviluppo di vapori pericolosi per la salute.

La colorazione con carbofucsina permette di evidenziare in maniera ottimale le caratteristiche morfologiche dei microrganismi ed è caratterizzata da maggiore specificità rispetto alla colorazione con fluorocromi, in confronto alla quale, tuttavia, richiede un tempo di osservazione maggiore.

La lettura dei preparati con fluorocromi richiede un microscopio a fluorescenza e una maggior esperienza da parte dell'operatore, ma comporta una sensibilità maggiore dato che, utilizzando ingrandimenti minori, permette a parità di tempo l'osservazione di aree più vaste del preparato (1-4).

Si consiglia la colorazione con carbofucsina per i laboratori aventi un basso carico di lavoro, mentre la colorazione con fluorocromi è raccomandata quando la routine superi i dieci vetrini al giorno.

Alcuni laboratori scelgono ancora oggi di preparare in proprio i reagenti per le colorazioni; prodotti di buona qualità pronti all'uso sono tuttavia facilmente reperibili in commercio (9).

6.2.1. COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELEN (CARBOLFUCSINA A CALDO)

Tutte le operazioni vanno eseguite sotto cappa chimica.

Reagenti:

- fucsina basica fenicata (carbolfucsina) di Ziehl: preparare una soluzione contenente 0,3 g di fucsina basica in 10 mL di etanolo al 95%. Dissolvere 5 g di fenolo cristallizzato in 100 mL di acqua distillata (se necessario scaldare leggermente per aiutare la dissoluzione). Mescolare i 10 mL della soluzione di fucsina con 90 mL della soluzione acquosa di fenolo. Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi;
- decolorante: aggiungere lentamente 3 mL di acido cloridrico concentrato a 97 mL di etanolo al 95%. Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi;
- colorante di contrasto: sciogliere 0,3 g di blu di metilene cloruro in 100 mL di acqua distillata. Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi.

Procedimento:

- coprire il vetrino con carbolfucsina di Ziehl. Scaldare lentamente, 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, se necessario, nuovo colorante in modo che il preparato rimanga costantemente coperto;
- lavare con acqua di fonte;
- decolorare con la miscela acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 secondi, fino a quando nel liquido di lavaggio non vi è più traccia di colorante;
- sciacquare il vetrino con acqua di fonte;
- colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi;
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica viene effettuata con obiettivo 100x, ad immersione.

I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore azzurro-blu (fig. 6.1).

6.2.2. COLORAZIONE DI KINYOUN (CARBOLFUCSINA A FREDDO)

Tutte le operazioni vanno eseguite sotto cappa chimica.

Reagenti:

- fucsina basica fenicata (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 siano stati sciolti a caldo 9 g di fenolo in cristalli. Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi;
- decolorante: aggiungere lentamente 3 mL di acido cloridrico concentrato a 97 mL di etanolo al 95%. Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi;
- colorante di contrasto: sciogliere 0,3 g di blu di metilene cloruro in 100 mL di acqua distillata. Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi.

Procedimento:

- coprire il vetrino con carbolfucsina di Kinyoun. Colorare per cinque minuti;
- lavare con acqua di fonte;

- decolorare con la miscela acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 secondi, fino a quando nel liquido di lavaggio non vi sia più traccia di colorante;
- lavare con acqua di fonte;
- colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi;
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica viene effettuata con obiettivo 100x, ad immersione.

I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore azzurro-blu.

6.2.3. COLORAZIONE FLUOROCROMICA CON AURAMINA E SUE VARIANTI

Reagenti:

- auramina: preparare una soluzione contenente 0,1 g di auramina O basica in 10 mL di etanolo al 95%; aggiungerla a 87 mL di acqua distillata nella quale siano stati sciolti 3 g di fenolo in cristalli.
Stabile a temperatura ambiente, al buio in bottiglia scura, per almeno tre mesi;
- decolorante: aggiungere 0,5 mL di acido cloridrico (HCl) concentrato a 100 mL di etanolo al 70%. Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi;
- colorante di contrasto: sciogliere 0,5 g di permanganato di potassio (KMnO₄) in 100 mL di acqua distillata.
Stabile a temperatura ambiente per almeno tre mesi.

Procedimento:

- coprire il vetrino con auramina, colorare per 15 minuti senza riscaldare;
- lavare con acqua di fonte;
- decolorare con la miscela 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 attenuando così la fluorescenza di eventuali bacilli alcol-acido-resistenti;
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica va effettuata entro 24 ore (la fluorescenza decade nel tempo); in caso di lettura ritardata conservare i vetrini al buio alla temperatura di 2-4 °C.

L'osservazione dei vetrini viene effettuata utilizzando un microscopio a fluorescenza dotato di lampada a vapori di mercurio e filtro BG-12, oppure di un'intensa sorgente di luce blu; si utilizzano obiettivi da 30-50x. I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono fluorescenti in giallo-arancio contro lo sfondo scuro (fig. 6.2).

Varianti della colorazione fluorocromica usano, come colorante primario, una miscela di auramina O e rodamina, che dà ai micobatteri un aspetto dorato, o, come colorante secondario, l'arancio di acridina, che produce uno sfondo rosso tendente all'arancio.

Nei casi dubbi è possibile "sovracolorare" con carbolfucsina, senza previa decolorazione, un preparato già colorato con fluorocromi.

6.2.4. AUTOMAZIONE DELLE PROCEDURE DI COLORAZIONE

Nei laboratori che giornalmente processano un numero elevato di campioni può essere utile l'utilizzo di coloratori (figg. 6.3, 6.4, 6.5, 6.6). La tabella I mostra i prodotti attualmente presenti in commercio che possono essere visionati ai seguenti link:

- Delcon: <http://www.delcon.it>
- Italscientifica: <http://www.italscientifica.it>
- Bio-Optica: <http://www.bio-optica.it>
- Leica: <http://www.leica-microsystems.com>

Queste apparecchiature consentono di colorare in automazione i preparati con tecnica Ziehl-Neelsen, Kinyoun e auramina/rodamina senza esposizione a vapori tossici. La colorazione eseguita su vetrini fissati al calore può avvenire secondo il principio della nebulizzazione in camera chiusa, che garantisce la massima sicurezza per l'operatore (9), oppure per immersione in vaschette dotate di coperchio e di un sistema integrato di aspirazione e filtrazione dei fumi. In genere, gli strumenti utilizzano kit di reagenti specifici e possono essere programmati in base al carico di lavoro quotidiano e all'intensità di colorazione desiderata. Per garantire un buon funzionamento, è fondamentale l'esecuzione sistematica delle operazioni di lavaggio a fine seduta.

Tab. I - PRINCIPALI COLORATORI AUTOMATICI.

Ditta	Denominazione strumento	Meccanismo di colorazione	Rischio di cross-contaminazione	N. vetrini per cestello	N. cestelli strumento	Immagine
Delcon	Aerospray AFB	Nebulizzazione	Assente	12-30	1	Figura 6.3
Italscientifica	Varistain Gemini	Immersione	Presente	20	14	Figura 6.4
Bio-Optica	Autocolor	Immersione	Presente	65	2	Figura 6.5
Leica	ST 4040	Immersione	Presente	20	5	Figura 6.6



FIG. 6.3. COLORATORE AUTOMATICO AEROSPRAY AFB.

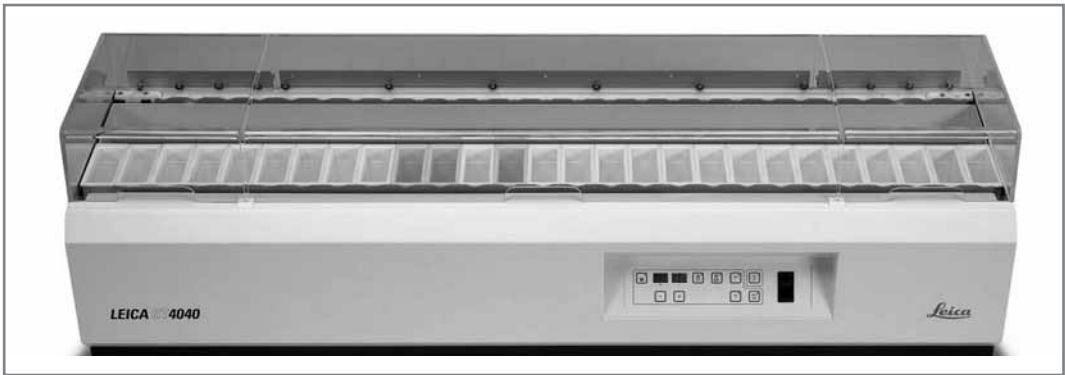


FIG. 6.4. COLORATORE AUTOMATICO VARISTAIN GEMINI.



Fig. 6.5. COLORATORE AUTOMATICO AUTOCOLOR.

Fig. 6.6. COLORATORE AUTOMATICO ST 4040.



6.2.5. LIMITI DELL'ESAME MICROSCOPICO

La alcol-acido-resistenza non è una proprietà tintoriale esclusiva dei micobatteri. Altri batteri che, analogamente ai micobatteri, contengono acidi micolici nella parete, possono mostrare vari gradi di alcol-acido-resistenza (*Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Gordonia* spp., *Tsukamurella* spp.). Anche *Legionella micdadei*, cisti di *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora* spp. sono dotati di alcol-acido-resistenza (8). Inoltre, mentre i micobatteri a lenta crescita sono stabilmente alcol-acido-resistenti, i micobatteri a rapida crescita possono variare nella capacità di trattenere la carbolfucsina, e talvolta non risultano fluorescenti dopo colorazione con auramina (10). La tabella 2 illustra le condizioni tecniche che più frequentemente possono causare risultati falsi negativi o falsi positivi.

La principale limitazione dell'esame microscopico è la sua scarsa sensibilità, che oscilla fra il 22% e il 78% di quella dell'esame colturale. Essa dipende dal microrganismo, dal metodo di colorazione e dall'esperienza del microscopista. Anche utilizzando le tecniche di concentrazione, la soglia di positività microscopica rimane comunque alta (1000-10.000 micobatteri per mL di materiale patologico) (1, 6, 8), di gran lunga superiore a quella dell'esame colturale (10-100/mL) (7, 8).

Tab. 2 - POSSIBILI CAUSE DI RISULTATI ERRATI IN MICROSCOPIA.

Condizione	Causa	Rimedio
Falso negativo	Preparato troppo spesso che si stacca durante la colorazione	Omogeneizzare adeguatamente il campione Non trasferire troppo materiale sul vetrino
	Preparato troppo sottile	Ripetere limitando l'area dello striscio
	Micobatteri non colorati o colorati male	Fissare correttamente i vetrini Conservare i coloranti in condizioni adeguate Rimuovere il più possibile l'acqua di risciacquo per non diluire i coloranti
Falso positivo	Contaminazioni crociate	Evitare l'uso di vaschette per colorazione Non mettere i vetrini a contatto fra loro durante la colorazione Pulire l'obbiettivo dopo ogni campione positivo
	Formazione di precipitati nei coloranti	Non usare coloranti scaduti Filtrare i coloranti

L'esame microscopico non fornisce alcuna informazione riguardo alla vitalità dei micobatteri osservati; non deve quindi stupire il reperto, in pazienti in terapia, di colture negative da campioni positivi all'esame microscopico. Il reperto di microscopia positiva ed esame colturale negativo può dipendere tuttavia anche dal fatto che alcune specie (tipico esempio *Mycobacterium bovis*) non sempre riescono a crescere sui comuni terreni di coltura.

6.2.6. CONTROLLO DI QUALITÀ

6.2.6.1. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Vetrini di controllo dovrebbero essere allestiti quotidianamente e comunque, obbligatoriamente, ad ogni cambio di lotto di colorante, allo scopo di verificare la corretta performance delle procedure.

La verifica è tanto più importante quanto minore è il numero di campioni esaminati dal singolo laboratorio. I controlli vanno letti e verificati prima di procedere all'osservazione microscopica dei campioni clinici. *Escherichia coli* e *Mycobacterium gordonae* (1) sono comunemente usati rispettivamente come controllo negativo e positivo. I controlli possono essere preparati a partire da una sospensione dei microrganismi di densità pari allo standard n.1 della scala McFarland, trasferendo una goccia sulla superficie di un vetrino, lasciando asciugare all'aria e procedendo poi come per gli altri preparati.

La congruità dei referti di microscopia può essere verificata valutando:

- il trend della percentuale dei campioni microscopico-positivi rispetto al numero totale delle colture (un abbassamento significativo può essere indice di problemi di colorazione);
- la presenza di campioni consecutivi, non provenienti dallo stesso paziente, positivi all'esame microscopico (possibile cross-contaminazione);
- il trend della percentuale dei campioni di escreato microscopicamente positivi con coltura negativa (un innalzamento significativo può essere imputabile a cross-contaminazione in fase di colorazione);

- il numero di campioni negativi alla microscopia che abbiano mostrato una crescita abbondante in terreno solido (un numero elevato è indice di microscopia inefficiente) (1).

6.2.6.2. CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO

Il moderno laboratorio di micobatteriologia prevede la partecipazione a un programma esterno di qualità per ogni aspetto della diagnostica erogata. Fra i programmi di *proficiency* disponibili in commercio, i seguenti si distinguono per l'invio di preparati adeguati a verificare la qualità della diagnostica microscopica.

- Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania) (<http://www.instand-ev.de>), spedisce 12 campioni all'anno recapitati in due invii. I vetrini arrivano già strisciati e debbono essere fissati, colorati e refertati con modalità semiquantitativa. I tempi di risposta sono piuttosto ristretti (una settimana circa).
- UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (NEQAS), London (UK) (<http://www.ukneqasmicro.org.uk>), è distribuito in Italia da Oxoid. Il programma NEQAS spedisce 3 volte l'anno 4 vetrini strisciati che debbono essere fissati, colorati e successivamente refertati con modalità qualitativa (presenza/assenza di bacilli alcol-acido-resistenti). La *deadline* per l'invio delle risposte è di circa un mese.
- Bio-development s.r.l. (Bio-dev), Milano (<http://www.biodev.com>), spedisce 4 volte l'anno un vetrino strisciato e fissato al calore che deve essere colorato e refertato qualitativamente (presenza/assenza di bacilli alcol-acido-resistenti). La *deadline* per l'invio delle risposte è di circa un mese.

L'abbonamento ai suddetti programmi fornisce un servizio con le seguenti caratteristiche: a) istruzioni complete per il trattamento dei vetrini che vanno ovviamente maneggiati come campioni potenzialmente infetti; b) valutazione statistica dei risultati con relativo punteggi; c) garanzia dell'anonimato; d) invio di un certificato di partecipazione.

6.3. OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

Si suggerisce di esaminare il vetrino senza fretta, osservando un numero adeguato di campi microscopici prima di considerarlo negativo (circa 80 campi usando la microscopia a fluorescenza e 300 campi usando la microscopia ottica a immersione) (1, 4). Il metodo di lettura deve garantire l'osservazione di una parte significativa del campione eseguendo una serie di passaggi lungo gli assi maggiore e minore del preparato (1). I micobatteri tubercolari appaiono come bastoncini lunghi e sottili (2-8x0,5 µm), talvolta ricurvi, isolati o più spesso riuniti in gruppetti. Talvolta possono presentare un aspetto bandeggiato con zone scarsamente colorate o del tutto prive di colore.

Alcune specie di micobatteri non tubercolari hanno un aspetto microscopico pleomorfo che può andare dalle forme coccoidi a quelle allungate. Raramente possono osservarsi micobatteri ramificati, più spesso tale morfologia è riferibile a presenza di *Nocardia* sp.

Qualora, in preparati allestiti da colture in terreno liquido, si osservino fasci serpentiformi alcol-acido-resistenti formati da numerosi bacilli allineati in lunghe file parallele (cordoni), la presenza di *Mycobacterium tuberculosis* è da ritenersi altamente probabile (fig. 6.7); un aspetto simile può essere eventualmente osservato solo in presenza di *Mycobacterium chelonae* o di *Mycobacterium ulcerans* (10).

È stato stimato che per mantenere la necessaria competenza nell'osservazione microscopica sia necessario esaminare non meno di 15 vetrini a settimana. Se il carico di lavoro cade sotto questa soglia, si consiglia di inviare i campioni a un laboratorio di livello superiore (1).

Per quanto riguarda il sistema di illuminazione del microscopio, in questi ultimi anni sta prendendo sempre più piede la tecnologia LED che presenta numerosi vantaggi rispetto ai sistemi basati su incandescenza, fluorescenza, alogeni e ioduri metallici (5). Il LED (*Light Emitting Diode*) è un semiconduttore (diodo) che emette luce al passaggio della corrente elettrica. Sviluppato per la prima volta nel 1962 da Holonyak, il LED, al contrario delle normali lampade, è privo di filamento interno e questa sua peculiarità gli permette di avere una durata e un'affidabilità di gran lunga superiore a quella delle vecchie tecnologie. I LED sono sempre più utilizzati in ambito illuminotecnico in sostituzione di alcune sorgenti di luce tradizionali, grazie anche al sostanziale incremento di rendimento che è stato possibile ottenere recentemente (fino a 40-60 lm/W). Come termini di paragone basti pensare che la resa di una lampada a incandescenza arriva a circa 20 lm/W, quella di una alogena a 25 lm/W e quella di una lampada a fluorescenza lineare a 104 lm/W.

Tra le peculiarità del LED figurano:

- l'elevata durata (LED ad alta emissione arrivano a circa 50.000 ore);
- l'assenza di costi di manutenzione;
- luce priva di componenti infrarosse e ultraviolette;
- colori saturi;
- effetto spot (sorgente praticamente puntiforme);
- elevata sicurezza, essendo a bassissima tensione (normalmente tra i 3 e i 24 Vdc);
- accensione a freddo fino a -40 °C;
- insensibilità a umidità e vibrazioni;
- assenza di mercurio.

6.4. REFERTAZIONE

L'esame microscopico ha un tempo di refertazione massimo di 24 ore lavorative a partire dall'arrivo del campione in laboratorio (1). La positività microscopica di pazienti non noti deve essere comunicata in modo tempestivo al clinico (telefonicamente o via fax) per permettere l'immediato isolamento del paziente, la cui contagiosità è direttamente proporzionale al numero di bacilli evidenziati.

È sempre bene programmare l'amplificazione genica su tutti i "nuovi" campioni positivi per distinguere rapidamente le infezioni da *Mycobacterium tuberculosis* complex da quelle da micobatteri non tubercolari.

L'esame negativo va refertato come: "Negativo per bacilli alcol-acido-resistenti"; quello positivo deve essere refertato, in base al tipo di colorazione utilizzata e al numero di bacilli alcol-acido-resistenti presenti nei campi microscopici osservati a diversi ingrandimenti, come indicato nello schema riportato in tabella 3 (1, 10).

Tab. 3 - SCHEMA DI REFERTAZIONE DELL'ESAME MICROSCOPICO IN BASE AL NUMERO DI BACILLI ALCOL-ACIDO-RESISTENTI OSSERVATI PER CAMPO MICROSCOPICO (A DIVERSI INGRANDIMENTI E USANDO DIVERSI TIPI DI COLORAZIONE).

BAAR^a osservati con la colorazione a base di:			Referto
Carbolfucsina (obbiettivo 100x)	Auramina (obbiettivo 20x)	Auramina (obbiettivo 40x)	
0	0	0	Negativo
1-2 per 300 campi	1-2 per 30 campi	1-2 per 70 campi	Rari bacilli alcol-acido-resistenti (inviare un nuovo campione per controllo) ^b
1-9 per 100 campi	1-9 per 10 campi	2-18 per 50 campi	Positivo +
1-9 per 10 campi	1-9 per campo	4-36 per 10 campi	Positivo ++
1-9 per campo	10-90 per campo	4-36 per campo	Positivo +++
>9 per campo	>90 per campo	>36 per campo	Positivo ++++

^a BAAR, bacilli alcol-acido-resistenti.

^b Se non si tratta di paziente con precedente positività.

BIBLIOGRAFIA

1. CLSI, *Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline*, 2008, CLSI, Wayne, PA.
2. Cernoch PL., Enns RK., Saubolle MA., Wallace RJ. Jr., *Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses*, 1994, Weissfeld AS., Washington DC.
3. Della-Latta P., Weitzman I., *Acid-fast procedures*, in: Isenberg HD. Ed., *Essential procedures for clinical microbiology*, 1998, ASM Press, Washington DC; 176-178.
4. Ebersole L., *Acid-fast stain procedures*, in: Isenberg HD. Ed., *Clinical microbiology procedures handbook*, 1992, American Society for Microbiology, Washington; 3.5.1-3.5.11.
5. Miller AR., Davis GL., Oden ZM., Razavi MR., Fateh A., Ghazanfari M., Abdolrahimi F., Poorazar S., Sakhaie F., Olsen RJ., Bahrmand AR., Pierce MC., Graviss EA., Richards-Kortum R., *Portable, battery-operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope*, 2010, PLoS One; 5:e11890.
6. Molinari GL., *Esame microscopico*, in: Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo DM. Ed., *Micobatteriologia clinica*, 2008, Selecta Medica, Pavia; 95-105.
7. Nolte FS., Metchock B., *Mycobacterium*, in: Murray PR., Baron EJ., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover RH. Ed., *Manual of clinical microbiology*, 1995, ASM Press, Washington DC; 400-437.
8. Pfyffer GE., Brown-Elliott BA., Wallace RJ. Jr., *Mycobacterium: general characteristics, isolation, and staining procedures*, in: Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., Pfaller MA., Tenover RH. Ed., *Manual of clinical microbiology*, 2003, ASM Press, Washington DC; 532-559.
9. Roberts GD., Hall L., Wolk DM., *Mycobacteria*, in: Truant AL. Ed., *Manual of commercial methods in clinical microbiology*, 2002, ASM, Washington DC; 256-273.
10. Weitzman I., *Acid-fast stains*, in: Isenberg HD. Ed., *Clinical microbiology procedures handbook*, 2004, ASM Press, Washington DC; 7.2.1-7.2.4.

Capitolo 7

DECONTAMINAZIONE E CULTURA

**Patrizia Chiaradonna,
Mirella Tronci**

7. DECONTAMINAZIONE E COLTURA

In letteratura sono riportate oltre 140 specie di micobatteri, molte delle quali sono patogene o potenzialmente patogene per l'uomo. La maggior parte di queste specie può essere isolata da campioni clinici utilizzando terreni di coltura liquidi o solidi. Alcuni micobatteri possiedono caratteristiche peculiari che li rendono difficili da coltivare in assenza di misure adeguate quali fattori di crescita, temperature e tempi di incubazione particolari; altri, come il *Mycobacterium leprae*, non crescono affatto sui terreni di coltura. Se comparata a quella di altri batteri, la crescita dei micobatteri è lenta e la comparsa delle colonie avviene in tempi che variano, a seconda delle specie, da pochi giorni a circa otto settimane, in condizioni ottimali di incubazione.

I campioni biologici da inoculare in coltura si suddividono in:

- contaminati dalla flora residente, quali ad esempio espettorato, espettorato indotto, aspirato gastrico, tampone laringeo, lavaggio bronco-alveolare, aspirato bronchiale, spazzolatura bronchiale, urine, feci, prelievi autoptici, sangue mestruale;
- non contaminati perché provenienti da siti sterili, quali ad esempio sangue, midollo osseo, liquidi cavitari, liquido cefalo-rachidiano, urine ottenute mediante puntura sovrapubica, aspirati da puntura trans-tracheale.

I campioni contaminati da flora residente richiedono un processo di decontaminazione e omogeneizzazione seguito da concentrazione. Qualora si tratti di materiali respiratori è necessaria anche la fluidificazione. Per i campioni sterili è sufficiente il processo di concentrazione, a meno che il clinico non segnali il sospetto di una concomitante infezione da altri batteri.

7.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

Prelievi bioptici:

Occorre ridurli in frammenti minuti con forbici o bisturi sterili o *tissue grinders* elettrici, quindi sospenderli in soluzione fisiologica e omogeneizzarli utilizzando mortaio e pestello sterili, prima di procedere all'esecuzione di esame microscopico e colturale. Nei casi in cui esista la possibilità di un'infezione da germi diversi dai micobatteri (su indicazione clinica o se la richiesta riguarda anche germi comuni) può essere utile eseguire in doppio l'esame colturale, sia prima che dopo decontaminazione.

Feci:

Il vetrino può essere eseguito direttamente dal campione (22, 50). Per l'esame colturale occorre sospendere una piccola quantità di materiale in 5 mL di brodo Middlebrook 7H9, omogeneizzare al vortex, filtrare su garza sterile per rimuovere i frammenti più grossolani e decontaminare (22).

Aspirato gastrico:

È necessario, prima della decontaminazione, neutralizzare il pH aggiungendo al campione carbonato di sodio (qualora non sia già stato fatto al momento del prelievo); in alternativa è possibile cen-

trifugare il campione, risospesando il sedimento in 5-10 mL di tampone fosfato 0,067 M a pH 6,8.

Liquidi cavitari:

È sufficiente concentrare per centrifugazione (3000 xg per 15 minuti) e quindi decantare ed eseguire lo striscio microscopico e la semina direttamente dal sedimento.

Nei casi in cui esista la possibilità di un'infezione da germi diversi dai micobatteri (su indicazione clinica o se la richiesta riguarda anche germi comuni) può essere utile eseguire in doppio l'esame colturale, sia prima che dopo decontaminazione.

Campioni raccolti con tampone:

Si deve porre il tampone in una provetta contenente 2-3 mL di soluzione fisiologica, agitare al vortex per almeno 30 secondi, recuperare il tampone e scartarlo dopo averlo spremuto contro la parete interna della provetta. Concentrare, mediante centrifugazione (3000 xg per 15 minuti), la sospensione così ottenuta e seminare il sedimento sia direttamente che previa decontaminazione.

Urine:

Il campione va centrifugato a 3000 xg per 15 minuti. Dopo decantazione e risospensione del sedimento in 5 mL di soluzione salina si procede alla decontaminazione.

7.2. DECONTAMINAZIONE

Principio:

La decontaminazione ha lo scopo di abbattere la carica microbica contaminante ai più bassi livelli possibili affinché non interferisca con la crescita dei micobatteri. La decontaminazione può influire sulla vitalità degli stessi micobatteri, perciò è buona regola scegliere sempre una procedura decontaminante non eccessivamente energica ed è fondamentale il rispetto dei tempi di contatto tra campione e decontaminante. Non esiste un metodo ideale, valido per tutti i campioni. È possibile utilizzare un'unica sostanza che agisca sia come decontaminante che come fluidificante, oppure due diversi agenti (9, 15, 22, 25, 26).

7.2.1. NALC-IDRATO DI SODIO

È il metodo più adottato e utilizza come agente fluidificante N-acetil-L-cisteina (NALC) e come decontaminante idrato di sodio (NaOH) alla concentrazione del 2%.

Reagenti:

- NaOH-citrato di sodio soluzione stock:
 - soluzione 1: 26 g di citrato di sodio anidro in 1000 mL di acqua distillata;
 - soluzione 2: 40 g di NaOH in 1000 mL di acqua distillata. Poiché NaOH è corrosivo, si suggerisce di indossare sempre guanti protettivi e indumenti di laboratorio.
Mescolare un ugual volume delle soluzioni 1 e 2 e autoclavare a 121 °C per 15 minuti in flaconi con tappo a vite. Conservare preferibilmente a 2-8 °C.
- Soluzione di lavoro NALC-NaOH-citrato di sodio:
preparare una soluzione allo 0,5% di NALC in NaOH-citrato di sodio, aggiungendo 0,5 g di NALC a 100 mL di NaOH-citrato di sodio. Questa soluzione è stabile per 24 ore e va preparata prima dell'uso.
- Tampone fosfato 0,067 M (pH 6,8):

- soluzione 1 (alcalina): aggiungere 9,47 g di Na_2HPO_4 a 1000 mL di acqua distillata;
- soluzione 2 (acida): aggiungere 9,07 g di KH_2PO_4 a 1000 mL di acqua distillata.
- Soluzione di lavoro:
unire uguali volumi delle due soluzioni e controllare il pH aggiungendo eventualmente piccoli volumi dell'una o dell'altra fino al raggiungimento del valore di 6,8. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti. Conservare preferibilmente a 2-8 °C.
- Soluzione allo 0,2% della frazione V di albumina bovina (opzionale): preparare sterilmente la soluzione di lavoro diluendo 1:10 una soluzione stock di albumina bovina al 2%.

Procedimento:

- porre in un provettone conico da 50 mL, dotato di tappo a vite, volumi uguali di campione e di soluzione decontaminante, facendo attenzione a non impiegare più di 10 mL di campione;
- agitare su vortex fino a che il materiale non sia ben omogeneizzato e successivamente mescolare più volte per inversione;
- lasciare riposare la provetta a temperatura ambiente per 15-20 minuti per permettere al decontaminante di agire;
- aggiungere tampone fosfato 0,067 M fino a 50 mL per bloccare l'azione lesiva del decontaminante e ridurre la viscosità della miscela. Per evitare contaminazioni crociate fare in modo che il flacone contenente il tampone non venga a contatto con le provette contenenti i campioni;
- avvitare accuratamente il tappo del provettone e mescolare per inversione;
- centrifugare a 3000 xg per 15 minuti (41) utilizzando una centrifuga dotata di cestelli con dispositivi antiaerosol e preferibilmente refrigerata poiché, a causa dell'elevato numero di giri e del conseguente innalzamento della temperatura, la vitalità dei micobatteri potrebbe venire compromessa;
- dopo la centrifugazione, eliminare il soprannatante e prelevare con una pipetta Pasteur una o due gocce di sedimento per allestire il vetrino; per evitare il distacco del materiale è possibile depositare sul vetrino, prima del campione, una goccia di liquido adesivo reperibile in commercio;
- risospendere il restante sedimento in non più di 2 mL di albumina bovina oppure in tampone fosfato. Verificare il pH. Se ancora alcalino, neutralizzare con una o più gocce di acido cloridrico (HCl) 2N;
- seminare il sedimento così preparato negli idonei terreni di coltura (fig. 7.1).

Controllo di qualità:

Per controllare la capacità decontaminante di ogni nuovo lotto di reagenti è necessario seminare tre o quattro campioni, dopo averli decontaminati, su piastre di agar cioccolato. Le colonie di contaminanti cresciute dopo 48 ore di incubazione a 37 °C dovrebbero essere in numero ridottissimo o del tutto assenti.

Nell'attività di routine è necessario tenere sotto controllo la percentuale di campioni contaminati.

La percentuale di inquinamento deve rimanere compresa fra il 3% e il 5%; una percentuale inferiore al 3% denota un processo di decontaminazione troppo energico, una percentuale superiore al 5% è indice di una decontaminazione troppo debole o di una incompleta fluidificazione. Nei terreni liquidi, la cui composizione è estremamente ricca, può risultare difficile rispettare il limite del 5% (17, 29); va ricordato tuttavia che, utilizzando, come è doveroso, terreni solidi e terreni liquidi in parallelo, si considerano contaminate quelle colture in cui entrambi i terreni non vanno

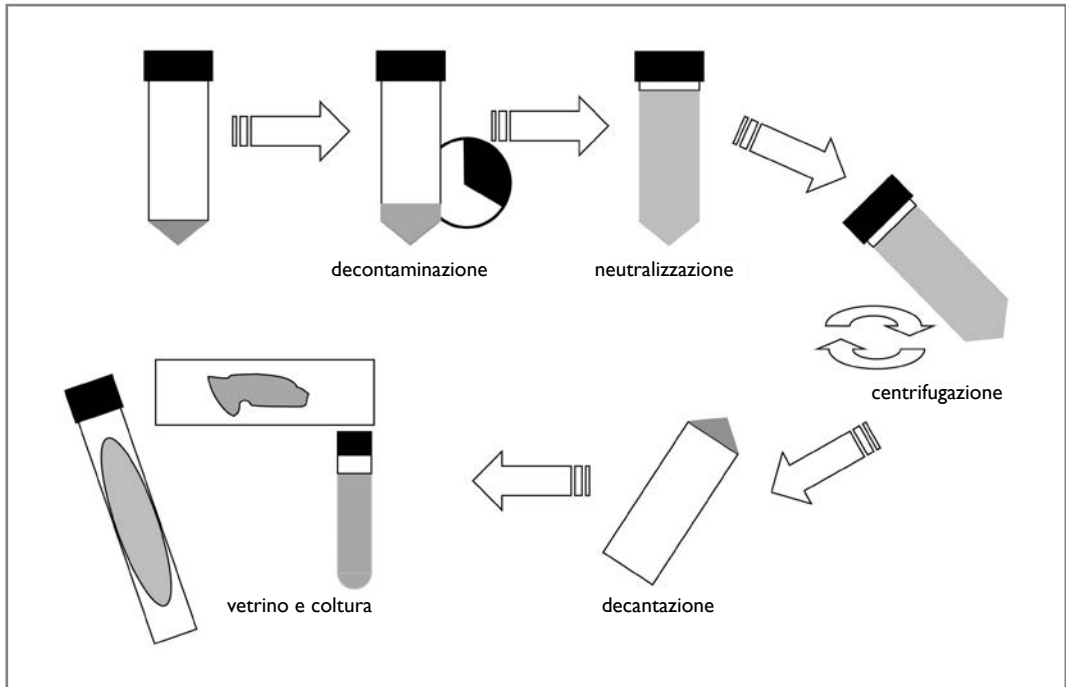


Fig. 7.1 - PROCEDURA DI DECONTAMINAZIONE.

a buon fine.

7.2.2. IDRATO DI SODIO 4% (METODO DI PETROFF)

L'idrato di sodio alla concentrazione del 4% possiede sia una funzione decontaminante che mucolitica; tale concentrazione risulta lesiva anche per i micobatteri, motivo per cui questo metodo è attualmente sconsigliato.

Reagenti:

- Soluzione al 4% di NaOH: sciogliere 40 g di NaOH in 1000 mL di acqua distillata. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti. Questa soluzione può essere conservata a temperatura ambiente;
- Soluzione di HCl 2N: diluire 33 mL di HCl concentrato in 200 mL di acqua distillata. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti. Questa soluzione può essere conservata a temperatura ambiente;
- Soluzione di rosso fenolo (indicatore): sciogliere 8 mg di rosso fenolo in polvere in 20 mL di una soluzione al 4% di NaOH. Portare a 1000 mL con acqua distillata. Questa soluzione può essere conservata a temperatura ambiente;
- Tampone fosfato 0,067 M (pH 6,8), soluzione di stock:
 - soluzione 1 (alcalina): aggiungere 9,47 g di Na_2HPO_4 a 1000 mL di acqua distillata;
 - soluzione 2 (acida): aggiungere 9,07 g di KH_2PO_4 a 1000 mL di acqua distillata;
- Soluzione di lavoro: unire uguali volumi delle soluzioni 1 e 2 e controllare il pH aggiungendo alcune gocce dell'una o dell'altra fino al raggiungimento del valore di 6,8. Sterilizzare a 121 °C

per 15 minuti. Conservare preferibilmente a 2-8 °C.

Procedimento:

- mettere in un provettone da 50 mL, uguali volumi di campione e di NaOH al 4%;
- agitare su vortex fino a che il materiale non sia ben omogeneizzato e lasciare riposare a temperatura ambiente per 15 minuti per permettere al decontaminante di agire;
- aggiungere tampone fosfato sterile fino a 50 mL;
- mescolare per inversione e centrifugare a 3000 xg per 15 minuti;
- eliminare il sopranatante, preparare il vetrino per la microscopia e aggiungere al sedimento una goccia di rosso fenolo;
- aggiungere alcune gocce di HCl 2N finché il colore non vira dal rosso al giallo persistente;
- risospendere il sedimento in 1-2 mL di acqua distillata o tampone fosfato sterile e seminare negli idonei terreni di coltura.

7.2.3. ACIDO OSSALICO

Il metodo che utilizza come decontaminante l'acido ossalico è raccomandato per campioni di origine respiratoria fortemente contaminati da *Pseudomonas aeruginosa*.

Reagenti:

- Acido ossalico al 5%: sciogliere 50 g di acido ossalico in 1000 mL di acqua distillata. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti. Questa soluzione può essere conservata a temperatura ambiente;
- Idrato di sodio al 4%: sciogliere 4 g di NaOH in granuli in 100 mL di acqua distillata e sterilizzare a 121 °C per 15 minuti;
- Rosso fenolo: sciogliere 8 g di polvere di rosso fenolo in 20 mL di NaOH al 4% e portare a 1000 mL con acqua distillata. Questa soluzione può essere conservata a temperatura ambiente;
- Soluzione fisiologica sterile: preferibile utilizzare le bottiglie del commercio.

Procedimento:

- mescolare uguali volumi di campione e acido ossalico al 5% in un provettone da 50 mL;
- agitare su vortex fino a che il materiale non sia ben omogeneizzato e lasciar riposare a temperatura ambiente per 30 minuti per permettere al decontaminante di agire. Di tanto in tanto agitare manualmente la provetta;
- aggiungere soluzione fisiologica sterile fino a 50 mL, chiudere bene e mescolare per inversione alcune volte;
- centrifugare a 3000 xg per 15 minuti;
- eliminare il sopranatante, utilizzare il sedimento per la preparazione del vetrino e aggiungere al sedimento poche gocce di rosso fenolo come indicatore;
- neutralizzare il sedimento con alcune gocce di NaOH al 4% finché non si ottiene un colore rosa pallido;
- risospendere il sedimento in non più di 2 mL di fisiologica e inocularlo nei terreni di coltura.

A causa della lesività di questo metodo, alcuni Autori suggeriscono di usarlo soltanto per la ridecontaminazione delle colture liquide in cui la decontaminazione standard con NALC-NaOH non abbia avuto successo (3, 4, 61).

7.2.4. ACIDO SOLFORICO

Tale metodo si utilizza esclusivamente per le urine in caso di persistente contaminazione.

Reagenti:

- Acido solforico al 4%: aggiungere 40 mL di acido solforico a 960 mL di acqua distillata. Conservare a 4 °C;
- Idrato di sodio al 4%: sciogliere 4 g di NaOH in 100 mL di acqua distillata. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti;
- Rosso fenolo: sciogliere 8 mg di polvere di rosso fenolo in 20 mL di NaOH al 4%. Portare a 1000 mL con acqua distillata. Questa soluzione può essere conservata a temperatura ambiente.

Procedimento:

- centrifugare l'intero campione (eventualmente distribuito in più provettoni da 50 mL) per 30 minuti a 3000 xg;
- eliminare il soprannatante e, nel caso siano stati preparati più provettoni da uno stesso campione, riunire insieme i vari sedimenti ottenuti;
- aggiungere un ugual volume di acido solforico al 4%;
- mescolare su vortex e lasciar riposare 15 minuti a temperatura ambiente per permettere al decontaminante di agire;
- portare a 50 mL con acqua distillata sterile;
- centrifugare a 3000 xg per 15 minuti;
- eliminare il soprannatante e allestire il vetrino;
- aggiungere al sedimento una goccia di rosso fenolo;
- neutralizzare aggiungendo NaOH al 4% fino alla comparsa di una colorazione rosa pallido stabile;
- inoculare nei terreni di coltura.

7.2.5. DECONTAMINAZIONE DEI CAMPIONI RESPIRATORI PROVENIENTI DA PAZIENTI AFFETTI DA FIBROSI CISTICA

Nei materiali di origine respiratoria provenienti da pazienti affetti da fibrosi cistica sono spesso presenti varie specie batteriche in carica elevata. La presenza, piuttosto frequente, di *Pseudomonas aeruginosa*, uno dei microrganismi più comunemente coinvolti, porta pressoché invariabilmente alla contaminazione della coltura per micobatteri. Per ovviare al problema i materiali suddetti vengono sottoposti a una doppia decontaminazione:

- trattamento preliminare con N-acetil-L-cisteina e idrato di sodio;
- seconda decontaminazione con acido ossalico, da eseguirsi direttamente sul sedimento ottenuto dal trattamento precedente. Il campione viene successivamente seminato nei normali terreni di coltura.

7.2.6. SISTEMI COMMERCIALI

Esistono prodotti del commercio pronti all'uso che forniscono tutti i reagenti per la decontaminazione secondo la procedura NALC-NaOH (42).

7.2.6.1. MYCOPREP

Il sistema BBL MycoPrep (Becton Dickinson) si compone di 10 flaconi da 75 mL (o da 150 mL) contenenti il sistema fluidificante-decontaminante NALC-NaOH e di 5 (o 10) bustine di tampone fosfato pH 6,8 da sciogliere in 500 mL di acqua distillata. Per attivare la soluzione di lavoro NALC-NaOH occorre schiacciare la fialetta di vetro contenente NALC presente all'interno del flacone con NaOH. Tale soluzione è stabile per 24 h a 2-8 °C.

Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

7.2.6.2. A.L.L. DIGESTION NEUTRALISATION

Il sistema A.L.L. Digestion Neutralisation (Biolife) è un kit completo per il trattamento anticoagulante, lisante, fluidificante (N-acetil-L-cisteina), decontaminante e neutralizzante dei campioni. È indicato soprattutto per il trattamento di campioni che saranno utilizzati per la ricerca di micobatteri con tecniche di amplificazione genica, piuttosto che con tecniche colturali, in quanto la presenza di EDTA sale sodico, utilizzato come anticoagulante, può inibire la crescita micobatterica anche se presente in percentuale molto bassa.

Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

7.2.6.3. NAC-PAC EA3

Il sistema di NAC-PAC EA3 (prodotto da AlphaTec e commercializzato da 'ARNIKA) contiene, oltre al reagente di digestione e decontaminazione (N-acetil-L-cisteina-NaOH), rosso fenolo come indicatore di pH. Questa particolarità permette di controllare (viraggio da rosso/rosa a incolore) il raggiungimento della neutralizzazione. È disponibile anche in confezionamento per singolo campione per prevenire la cross-contaminazione. È utilizzabile per coltura e per amplificazione genica.

Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

7.2.6.4. MYCOPROSAFE

Il kit MYCOPROSAFE (prodotto da Salubris e commercializzato da DID) contiene tutti i reagenti necessari per la decontaminazione e concentrazione del campione biologico (N-acetil-L-cisteina, NaOH, citrato trisodico e tampone fosfato), confezionati per il trattamento di campioni singoli. Viene fornita anche una soluzione disinfettante (ipoclorito di sodio) da utilizzare per decantare il soprannatante e per l'eliminazione finale del materiale contaminato.

Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

7.2.7. CONTAMINAZIONI

Non sempre il processo di decontaminazione dà i risultati attesi. In presenza di colture contenenti sia bacilli alcol-acido-resistenti che contaminanti è possibile fare una subcoltura da una minima quantità di crescita su una piastra di Middlebrook 7H10 o Middlebrook 7H11, strisciando accuratamente al fine di ottenere colonie quanto più possibile isolate. Dalle colonie eventualmente cresciute devono essere allestiti preparati microscopici per verificarne l'alcol-acido-resistenza e la purezza. È anche possibile ridecontaminare una coltura liquida contaminata con pari volume di NaOH al 4% e successivamente procedere a un nuovo inoculo. In caso di contaminazione da cocci Gram-positivi è consigliabile aggiungere al terreno liquido, oltre al normale supplemento, vancomicina in quantità tale da avere una concentrazione finale nel *medium* di 2 µg/mL (10).

7.3. ESAME COLTURALE

Gli attuali standard internazionali raccomandano l'uso di due terreni (terreno liquido e terreno solido) per l'isolamento dei micobatteri da campioni biologici (34, 36, 53).

7.3.1. COLTURA IN TERRENO SOLIDO

Principio:

La coltura in terreno solido può essere eseguita a partire da qualsiasi tipo di materiale biologico.

La crescita dei micobatteri avviene più comunemente a 35-37 °C, ma per alcune specie sono richieste temperature di crescita differenti, quali ad esempio 30 o 42 °C.

La scelta del terreno di isolamento dipende da molti fattori, tra i quali il tipo di campione è sicuramente quello più importante; per campioni provenienti da siti normalmente sterili si scelgono terreni non selettivi, mentre per campioni pesantemente contaminati è fondamentale utilizzare un terreno selettivo, dato che non è raro che la decontaminazione non riesca a eliminare tutta la flora batterica presente.

I terreni preparati direttamente in laboratorio, anche se più fertili, necessitano di un attento controllo di qualità e forniscono una performance meno standardizzata rispetto a quelli pronti del commercio sottoposti a rigorosi controlli di qualità dal produttore.

Poiché nessun terreno di coltura è ideale, la scelta di terreni all'uovo o terreni agarizzati è affidata all'esperienza del microbiologo.

7.3.1.1. TERRENI ALL'UOVO

Si tratta di terreni a base di uova fresche, fecola di patate, sali e glicerolo, preparati a becco di clarino, in provette con tappo a vite, e fatti solidificare per coagulazione al calore. Essi contengono, come inibitore della flora residente, verde di malachite in diversa concentrazione: il Löwenstein-Jensen ne contiene 0,025%, il Petragnani 0,052%, l'American Thoracic Society *medium* (ATS) 0,02%, e l'International Union Tuberculosis *Medium* (IUTM) 0,025%. Il Löwenstein-Jensen è il più frequentemente utilizzato, il Petragnani, con la sua alta percentuale di verde di malachite, può essere utile in caso di materiali fortemente contaminati, l'ATS permette una crescita più rapida e più abbondante. Lo IUTM differisce dal Löwenstein-Jensen esclusivamente per l'assenza di fecola di patata; i terreni Coletsos e Gottsacker contengono anche piruvato e risultano particolarmente adatti alla coltura di *Mycobacterium bovis*.

Vantaggi:

- possono essere conservati per molti mesi in frigorifero dato che il tappo a vite minimizza l'evaporazione;
- forniscono un ottimo supporto nutritivo per la crescita di *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Limiti:

- in caso di contaminazione viene coinvolta in genere tutta la superficie del tubo;
- occorrono 3-6 o più settimane per lo sviluppo delle colonie;
- la conta delle colonie è problematica a causa della ridotta superficie del becco di clarino;
- la crescita di molte specie di micobatteri non tubercolari e in modo particolare del *Mycobacte-*

rium avium complex non è soddisfacente (7).

7.3.1.2. TERRENI A BASE DI AGAR

Il brodo Middlebrook 7H9, composto di sali, vitamine, acido oleico, albumina, catalasi, glicerolo al 2% (che favorisce la crescita di *Mycobacterium avium* complex) e destrosio, costituisce la base dei terreni agarizzati. Il terreno solido Middlebrook 7H10 comprende, oltre alla base del 7H9, agar e verde di malachite (0,0025%), e il Middlebrook 7H11 anche l'idrolisato di caseina allo 0,01%. Quest'ultima sostanza favorisce lo sviluppo dei ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti all'isoniazide (31). Tali terreni possono essere distribuiti, oltre che in provette, anche in piastre Petri.

Vantaggi:

- contengono una quantità minore di nutrienti rispetto a quelli all'uovo, con la conseguenza che le contaminazioni sono meno frequenti;
- la trasparenza dei terreni agarizzati permette una rilevazione precoce della crescita. Se il terreno è distribuito in piastre, le microcolonie possono essere osservate al microscopio rendendone più facile l'osservazione e la conta (60).

Limiti:

- i terreni contenuti in piastre tendono più facilmente a essiccarsi durante l'incubazione;
- l'esposizione del terreno alla luce naturale o il mantenimento dello stesso a 4 °C per più di quattro settimane provocano il rilascio di formaldeide, che inibisce la crescita dei micobatteri;
- necessitano di incubazione in presenza di CO₂;
- benché i terreni all'agar permettano una più precoce evidenziazione dei micobatteri, i terreni all'uovo, dopo incubazione prolungata, sono caratterizzati da maggior sensibilità;
- sono più costosi rispetto ai terreni all'uovo.

7.3.1.3. TERRENI ADDIZIONATI CON FATTORI DI CRESCITA

Qualora si sospetti la presenza di *Mycobacterium haemophilum*, soprattutto nel caso di pazienti gravemente immunodepressi con lesioni cutanee o in presenza di linfadeniti in età pediatrica (che colpiscono anche i bambini immunocompetenti), possono essere utilizzati sia terreni a base di uovo, addizionati con ammonio citrato ferrico all'1%, che terreni agarizzati addizionati con emina allo 0,2% (9, 45).

7.3.1.4. TERRENI SELETTIVI

L'uso di terreni solidi addizionati con antibiotici può aumentare in maniera sostanziale la possibilità di isolare micobatteri dai campioni pesantemente contaminati. Il terreno di Gruft è costituito da Löwenstein-Jensen addizionato con penicillina (50 U/mL) e acido nalidixico (35 µg/mL). Il Löwenstein-Jensen selettivo contiene cicloeximide (400 µg/mL), lincomicina (2 µg/mL) e acido nalidixico (35 µg/mL). Il 7H11 di Mitchison e il Löwenstein-Jensen con PACT contengono come inibitori polimixina B (200 U/mL), amfotericina B (200 U/mL), carbenicillina (50 µg/mL) e trimetoprim (20 µg/mL).

7.3.1.5. GESTIONE DEI TERRENI SOLIDI

Dopo l'omogeneizzazione e l'eventuale decontaminazione, i campioni vanno inoculati nelle provette di terreno all'uovo in ragione di 0,10-0,25 mL (2-4 gocce) per ciascuna, distribuendo il liquido su tutta la superficie. Le provette devono essere incubate in posizione inclinata, in modo che il mate-

riale possa ricoprire per intero tutta la superficie del becco di clarino, con il tappo lasciato allentato per permettere l'evaporazione della parte liquida dell'inoculo. Dopo una settimana circa, quando il terreno è ben asciutto, stringere il tappo; a questo punto è possibile proseguire l'incubazione in posizione verticale.

Qualora si preferisca utilizzare piastre, queste vanno inoculate deponendo con una pipetta tre gocce distinte, ugualmente distanziate tra loro. Le piastre così inoculate devono rimanere a temperatura ambiente fino a completo assorbimento del liquido e successivamente messe in incubatore a CO₂ all'interno di sacchetti di polietilene (permeabili alla CO₂) che ne evitino l'essiccamento.

Sia che si utilizzino terreni all'uovo che terreni agarizzati, l'incubazione deve essere protratta per almeno 8 settimane, ma l'incubazione fino a 12 settimane è raccomandata per permettere la crescita anche dei ceppi disgonici o a crescita particolarmente lenta quali *Mycobacterium ulcerans* e *Mycobacterium malmoense*. L'incubazione dei terreni in atmosfera contenente CO₂, in concentrazione compresa tra il 5% e il 10%, è indispensabile per i terreni di Middlebrook 7H10 e 7H11 (5) e favorisce lo sviluppo dei micobatteri anche sui terreni all'uovo. La stimolazione massima della crescita da parte della CO₂ si verifica nel periodo compreso tra il 4° e il 10° giorno di incubazione.

La temperatura di incubazione deve essere compresa tra 35 °C e 37 °C. Per campioni di origine cutanea o quando il clinico sospetti la presenza di particolari specie micobatteriche (*Mycobacterium marinum* o *Mycobacterium ulcerans*), si raccomanda di seminare due set di terreni, di cui uno incubato a 37 °C e uno a temperatura inferiore (30-32 °C). È consigliabile prolungare i tempi di incubazione oltre le 8 settimane anche nel caso di linfadenopatie in età pediatrica con microscopia positiva e negatività colturale rilevata nei tempi standard.

Si raccomanda che tutti i terreni solidi all'uovo siano esaminati settimanalmente per verificare se vi sia stata crescita di micobatteri e di eventuali contaminanti. La lettura delle piastre può essere effettuata a partire dal 2° giorno di incubazione, aiutandosi con un microscopio; esse vanno osservate capovolte, a piccolo ingrandimento (obbiettivo 10x), per evidenziare meglio la presenza di microcolonie (60) (fig. 7.2).

Dalle colonie eventualmente cresciute sulla superficie dei terreni di coltura (fig. 7.3) deve essere allestito un vetrino per differenziare i bacilli alcol-acido-resistenti dagli eventuali contaminanti.

7.3.1.6. CONTROLLO DI QUALITÀ

È importante controllare tutti i lotti di terreno, sia quelli preparati in laboratorio che quelli acquistati dal commercio; questi ultimi infatti, pur essendo sottoposti a controlli da parte dei produttori, possono aver subito danni nella fase di trasporto e conservazione. Terreni di ogni nuovo lotto dovrebbero essere inoculati con una sospensione (torbidità 1 McFarland diluita 1/100) di colture fresche di *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478) e *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841). Un controllo deve essere poi eseguito con un ceppo di *Escherichia coli* (ATCC 25922) per verificare la parziale inibizione da parte dei terreni non selettivi (nei quali è tuttavia presente il verde malachite) e l'inibizione completa di quelli selettivi (7). Tutti i terreni così inoculati vanno incubati con le stesse modalità adottate per i campioni clinici.

7.3.2. COLTURA IN TERRENO LIQUIDO

I terreni liquidi, pur consentendo un rilevamento più sensibile e precoce della crescita rispetto

ai terreni solidi, sono stati a lungo considerati di scarsa utilità pratica a causa dell'altissima percentuale di contaminazioni. Recentemente, grazie all'impiego di miscele antibiotiche che permettono di contenere entro livelli accettabili il tasso di contaminazione, i terreni liquidi hanno trovato largo impiego consentendo di abbreviare sensibilmente i tempi della coltura. Inoltre il terreno liquido è di fondamentale importanza non soltanto per la rapidità della crescita, ma anche perché alcune specie di micobatteri crescono meglio (*Mycobacterium avium* complex) o crescono esclusivamente (*Mycobacterium genavense*) in terreno liquido.

Il più importante terreno liquido, il Middlebrook 7H9, contiene sali, vitamine, cofattori enzimatici, albumina, catalasi, glicerolo e destrosio; la presenza di Tween 80, una sostanza tensioattiva, favorisce una crescita più omogenea dei micobatteri nel *medium* di coltura. Il Middlebrook 7H9 è usato come terreno base per numerosi sistemi di coltura, siano essi manuali o automatizzati. In questi terreni la crescita si rileva evidenziando la presenza di attività metaboliche.

7.3.2. I. SISTEMI MANUALI

7.3.2.1.1. Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT)

Principio:

Il sistema MGIT (Becton Dickinson) utilizza una provetta di plastica con tappo a vite contenente 4 mL di brodo 7H9 con 0,25% di glicerolo. Alla base della provetta è adeso, in un film di silicone, un sale metallico di rutenio, che è fluorescente e sensibile alle variazioni della concentrazione di O₂. L'elevato contenuto iniziale di O₂ nella provetta inattiva la fluorescenza, ma il consumo di O₂ operato dai microrganismi durante la crescita determina la comparsa di un'intensa fluorescenza arancio, all'altezza del fondo e del menisco, quando la provetta sia esposta a raggi ultravioletti (fig. 7.4). In questo terreno possono essere seminati tutti i tipi di campioni biologici ad eccezione del sangue e dei campioni fortemente ematici, poiché la fluorescenza viene neutralizzata dalla presenza del sangue.

Il sistema può essere usato anche per la valutazione della sensibilità ai farmaci antitubercolari.

Reagenti:

- Provetta di terreno MGIT. La provetta può essere conservata a temperatura ambiente;
- Arricchimento OADC, composto da acido oleico, albumina bovina, destrosio e catalasi; da conservare a 2-8 °C;
- Miscela di antibiotici PANTA, composta da polimixina B, amfotericina B, acido nalidixico, trimetoprim, azlocillina; da conservare a 2-8 °C.

Procedimento:

- prima dell'inoculo aggiungere nella provetta contenente il terreno MGIT, OADC (0,5 mL) e la miscela antibiotica PANTA (0,1 mL);
- con una pipetta sterile inoculare 0,5 mL di materiale decontaminato o, per i materiali provenienti da siti sterili, semplicemente concentrato;
- i tubi, ben chiusi, devono essere miscelati per inversione e incubati a 37 °C per almeno 42 giorni
- le letture si effettuano 2-3 volte a settimana esponendo le provette ad una lampada di Wood, o a un transilluminatore, per evidenziare la presenza di fluorescenza; è possibile anche utilizzare un lettore per provette singole (BD BACTEC *MicroMGIT* Fluorescence Reader);
- nei casi dubbi la fluorescenza può essere confrontata con un controllo positivo (provetta contenente una soluzione di solfito di sodio allo 0,4%) e con un controllo negativo (provetta

MGIT non inoculata);

- in presenza di fluorescenza eseguire un preparato microscopico per verificare la crescita di bacilli alcol-acido-resistenti e contestualmente eseguire una semina su agar cioccolato.

Il tempo medio di crescita è di 15 giorni (range compreso tra 2 e 56 giorni) (2, 11, 19, 38, 56).

7.3.2.1.2. MB Redox

Principio:

Il sistema MB Redox (Merck) utilizza una provetta di vetro munita di tappo a vite dotato di un setto di gomma per l'eventuale inoculo con siringa. Essa contiene terreno di Kirchner modificato con l'aggiunta di glucosio, siero di cavallo, complessi vitaminici, OADC e catalasi. Il sistema rivelatore è costituito da un sale incolore di tetrazolio che i microrganismi in attiva crescita riducono a formazano, composto insolubile di colore rosa, rosso o violetto. Quest'ultimo si deposita sulla superficie delle microcolonie rendendole visibili come particelle colorate (fig. 7.5).

Il sistema non è utilizzabile per la valutazione della sensibilità ai farmaci antitubercolari (30).

Reagenti:

Le provette MB Redox sono pronte all'uso e contengono, oltre al terreno di Kirchner, una miscela di antimicrobici costituita da polimixina B, amfotericina B, carbenicillina e trimetoprim.

Devono essere conservate a 2-8 °C.

Procedimento:

- inoculare la provetta con 0,5 mL di materiale decontaminato o, per i materiali provenienti da siti sterili, semplicemente concentrato;
- incubare per 8 settimane a 37 °C, in posizione verticale;
- ispezionare le provette almeno bisettimanalmente ricercando, dopo averle agitate, la presenza di fiocchetti in sospensione o di torbidità uniforme di colore rosa-violetto;
- eseguire un preparato microscopico per verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti e una semina su agar cioccolato per evidenziare eventuali contaminanti.

Il tempo medio di crescita è di 18,9 giorni (range compreso tra 2 e 74 giorni) (8, 19, 30, 33, 40, 51).

7.3.2.1.3. Controllo di qualità

La fertilità di ciascun lotto dei terreni MGIT e MB Redox deve essere controllata con ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478) e *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841).

7.3.2.2. SISTEMI AUTOMATICI

Per molti anni l'unico sistema di coltura in grado di rilevare la crescita dei micobatteri in tempi clinicamente utili è stato il sistema radiometrico. Attualmente esso è stato sostituito da altri sistemi non radiometrici che utilizzano apparecchiature completamente automatizzate (*walk-away*) idonee alla gestione computerizzata dei dati e interfacciabili con il sistema gestionale del laboratorio. Le caratteristiche dei sistemi attualmente in commercio sono sintetizzate nella tabella I. Il rilevamento di prodotti del metabolismo microbico con metodiche sensibili e automatizzate abbrevia in maniera significativa i tempi di *detection* dei micobatteri nei campioni clinici.

7.3.2.2.1. BACTEC 460TB

Principio:

Il BACTEC 460TB (Becton Dickinson) è stato il primo sistema semiautomatico introdotto nei

Tab. I - VALUTAZIONE COMPARATIVA DEI SISTEMI AUTOMATICI ATTUALMENTE DISPONIBILI IN ITALIA (16).

Caratteristiche	BACTEC MGIT	BACTEC 9000	VersaTREK	MB/BacT
Formato	automatico	automatico	automatico	automatico
Emocolture	NO	SÌ	SÌ	SÌ
Rilevamento	fluorimetrico	fluorimetrico	pressometrico	colorimetrico
Volume inoculo (mL)	0,5	0,5-1,0	0,5-1,0	0,5
Capacità	320/960	240	128/256/384	120/240
Volume terreno (mL)	7	40	12,5	10
Gestione dati	SÌ	SÌ	SÌ	SÌ
Antibiogramma	SÌ	NO	SÌ	NO
Tempi medi di <i>detection</i> (gg)	11-13	11-13	11-15	13-17

laboratori di micobatteriologia. Esso ha rappresentato per molto tempo il sistema di riferimento sia per l'isolamento dei micobatteri che per l'esecuzione del test di farmaco-sensibilità (32, 48). Utilizzava flaconi sigillati contenenti 4 mL di brodo 7H12 (BACTEC 12B) composto da Middlebrook 7H9 modificato con l'aggiunta di albumina bovina, idrolisato di caseina, catalasi e acido palmitico ^{14}C -radiomarcato. Quest'ultimo, metabolizzato dai microrganismi in crescita, portava al rilascio di anidride carbonica ^{14}C -radiomarcata ($^{14}\text{CO}_2$). La quantità di $^{14}\text{CO}_2$ presente nell'atmosfera confinata delle boccette veniva rilevata da un γ -counter e convertita in un indice di crescita proporzionale al numero di micobatteri vitali presenti nella coltura (fig. 7.6). L'utilizzo di ^{14}C , caratterizzato da un lunghissimo tempo di decadimento, ha prima limitato e in seguito marginalizzato l'uso ai fini diagnostici del sistema. Il sistema non è più commercializzato nel nostro Paese.

7.3.2.2.2. BACTEC MGIT 960

Principio:

Il sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) è totalmente automatizzato e permette l'incubazione simultanea di 960 provette (46). Per rilevare la crescita batterica il sistema utilizza la stessa tecnologia fluorimetrica alla base del sistema MGIT manuale.

La provetta MGIT contiene 7 mL di brodo Middlebrook 7H9 modificato, che viene successivamente addizionato con OADC e con la miscela antibiotica PANTA. Alla base della provetta è adeso, in un film di silicone, un sale metallico di rutenio che è fluorescente e sensibile alle variazioni della concentrazione di O_2 . L'elevato contenuto iniziale di O_2 nella provetta inattiva la fluorescenza ma il consumo di O_2 operato dai microrganismi durante la crescita determina la comparsa di un'intensa fluorescenza arancio, all'altezza del fondo e del menisco, quando la provetta è esposta a raggi ultravioletti.

Le provette inserite nello strumento BACTEC MGIT 960 vengono incubate a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e monitorate ogni 60 minuti per rilevare l'eventuale aumento di fluorescenza. Un algoritmo individua, sulla base della variazione di intensità della fluorescenza, i campioni positivi che vengono notificati con segnali acustico e luminoso (fig. 7.7).

Reagenti:

- Provetta di terreno MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*), che può essere conservata a



Fig. 7.6. SISTEMA BACTEC 460TB.



Fig. 7.7. STRUMENTO BACTEC MGIT 960.

temperatura ambiente;

- Arricchimento OADC, composto da acido oleico, albumina bovina, destrosio, poliossietilene-stearato e catalasi, da conservare a 4 °C;
- PANTA, miscela di antibiotici liofilizzati composta da polimixina B, amfotericina B, acido nalidixico, trimetoprim, azlocillina, da conservare a 4 °C.

Procedimento:

- le provette, addizionate di OADC e PANTA, vengono inoculate con 0,5 mL di campione decontaminato o, per i materiali provenienti da siti sterili, semplicemente concentrato. Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD;
- le provette inoculate sono caricate nello strumento, dove vengono lasciate a una temperatura di 37 °C per 6 settimane o fino alla comparsa di positività. Sulle provette positive deve essere eseguito un preparato microscopico, atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti, e contestualmente, una semina su agar cioccolato. Quando lo strumento segnala il termine del periodo di incubazione è buona regola, prima di eliminare le provette considerate negative, esaminarle visivamente per individuare l'eventuale presenza di torbidità o di granuli che potrebbero indicare una crescita non rilevata dallo strumento. In quest'ultimo caso occorre eseguire un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti. Il tempo medio di crescita (12, 17, 55, 62) è 11,7 giorni per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia positiva (range 5-26); per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia negativa 16,5 giorni (range 5-43); per micobatteri non

tubercolari 16,3 giorni; per *Mycobacterium avium* complex 7,6 giorni.

Caratteristiche del sistema:

Il sistema è completamente automatico, non radiometrico, non invasivo e utilizza provette di plastica con tappo a vite, il cui inoculo non richiede l'utilizzo di aghi. Può essere utilizzato per l'esecuzione del test di farmaco-sensibilità. Il sistema non può essere utilizzato per le emocolture o per campioni fortemente contaminati da sangue, poiché la fluorescenza viene neutralizzata dalla presenza di quest'ultimo.

La percentuale di contaminazioni è mediamente non inferiore al 6-7% (17, 55).

Per i campioni in cui si sospetti la presenza di micobatteri con optimum di crescita a temperature diverse da 37 °C, è necessario incubare, al di fuori dell'apparecchio, una seconda provetta MGIT alla temperatura richiesta; questa verrà letta manualmente a luce ultravioletta o mediante un apposito lettore per provette singole.

7.3.2.2.3. BacT/ALERT 3D

Principio:

Il sistema BacT/ALERT 3D (bioMérieux) è totalmente automatico e non radiometrico (28).

Utilizza flaconi di due tipi, di cui uno dedicato esclusivamente alla coltura di campioni ematici. Il flacone da utilizzare per i campioni diversi da sangue contiene 10 mL di brodo Middlebrook 7H9 arricchito con caseina, sieroalbumina bovina e catalasi. Al terreno contenuto nei flaconi devono essere aggiunti, prima della semina, 0,5 mL di miscela antibiotica e di fluido di arricchimento.

Al fondo di ogni flacone è presente un sensore permeabile ai gas che vira progressivamente dal verde al giallo in presenza di CO₂ prodotta da microrganismi in fase attiva di crescita.

I flaconi sono incubati all'interno dello strumento BacT/ALERT 3D in celle apposite che presentano alla base un'unità di lettura dotata di un riflettometro elettronico che registra le variazioni colorimetriche dei flaconi (fig. 7.8). I valori rilevati sono trasmessi ogni 10 minuti a un computer che segnala i flaconi in cui è presente crescita. La positività viene segnalata dallo strumento con un



**Fig. 7.8. SISTEMA
BacT/ALERT 3D.**

segnale visivo e acustico.

Reagenti:

- Flaconi BacT/ALERT MP: contengono il terreno di coltura e sono dotati di tappo con setto di gomma. Devono essere conservati a temperatura di 2-8 °C, al riparo dalla luce;
- MB/BacT supplemento antibiotico: miscela antibiotica liofilizzata contenente amfotericina B, azlocillina, acido nalidixico, polimixina B, trimetoprim e vancomicina; da conservare a temperatura di 2-8 °C, al riparo dalla luce;
- MB/BacT liquido di ricostituzione: arricchimento costituito da acido oleico, glicerolo, amaranto e sieroalbumina bovina; da conservare a temperatura di 2-8 °C, al riparo dalla luce.

Procedimento:

- i flaconi vengono inoculati con 0,5 mL di campione decontaminato o, per materiali provenienti da siti sterili, semplicemente concentrato. Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD;
- i flaconi inoculati sono caricati nello strumento, dove vengono lasciati per 6 settimane, o fino alla comparsa di positività, a una temperatura di 35 °C;
- su tutti i flaconi positivi deve essere eseguito un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti e, contestualmente, una semina su agar cioccolato
- al termine dell'incubazione è buona regola esaminare visivamente tutti i flaconi negativi per individuare l'eventuale presenza di torbidità o granuli che potrebbero indicare una crescita non rilevata dallo strumento. In quest'ultimo caso deve essere eseguito un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti.

Il tempo medio di crescita (16, 39, 43, 44) è: per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia positiva, 13,3 giorni (range 5-47); per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia negativa, 23,3 giorni (range 7-40); per i micobatteri non tubercolari, 22,8 giorni (range 3-75).

Caratteristiche del sistema:

Il sistema è completamente automatico, esente da rischio di cross-contaminazioni e la gestione dei dati è completamente computerizzata (39, 43, 44). Non è utilizzabile per l'esecuzione del test di farmaco-sensibilità. Non è possibile l'incubazione a temperature differenziate per favorire la crescita di specie con esigenze particolari. L'inoculo dei campioni avviene tramite siringa. Questa procedura, oltre ad essere pericolosa per l'operatore, è causa di difficoltà di inoculo in presenza di materiale non finemente omogeneizzato (16).

Sono stati segnalati falsi negativi in campioni provenienti da pazienti in trattamento con farmaci antimicobatterici. Sembra che, in questi casi, i micobatteri cresciuti in coltura non siano in grado di produrre sufficienti quantità di CO₂ da risultare rilevabili dallo strumento (39).

7.3.2.2.4. VersaTREK Culture System II

Principio:

VersaTREK Culture System II (TREK Diagnostic Systems) è un sistema automatico, a rilevazione pressometrica, che permette la coltura di micobatteri da tutti i materiali, sangue compreso (27). Il terreno utilizzato, contenuto in flaconi di vetro (fig. 7.9) al cui interno sono presenti spugne di cellulosa che fungono da supporto meccanico per la crescita batterica, è a base di brodo Middlebrook 7H9 addizionato di casitone, glicerolo e bicarbonato di sodio. Ad ogni flacone deve essere aggiunto



Fig. 7.9. SISTEMA VERSATREK.

un supplemento di crescita e, per i campioni provenienti da siti non sterili, una miscela di antibiotici.

La tecnologia VersaTREK è basata sul rilevamento dei cambiamenti di pressione che avvengono nello spazio sovrastante il terreno di coltura presente all'interno del flacone. Tali cambiamenti sono dovuti al consumo di O_2 e alla produzione di gas che accompagnano l'eventuale crescita batterica. Lo strumento VersaTREK *Culture System II* rileva la crescita micobatterica monitorando automaticamente ogni 24 minuti le variazioni pressorie all'interno del flacone tramite un connettore (applicato al flacone subito dopo l'inoculo) che lo collega allo strumento. Questa informazione è utilizzata per generare una curva di crescita che, analizzata in base a un algoritmo interno, permette di stabilire lo stato del campione.

La positività viene notificata con un segnale visivo.

Reagenti:

- VersaTREK Myco: flacone di terreno da conservare a temperatura ambiente in luogo protetto dalla luce;
- Due miscele di antibiotici da usare in alternativa e da conservare a 2-8 °C;
 - VersaTREK Myco AS, contenente polimixina B, azlocillina, fosfomicina, acido nalidixico e amfotericina B;
 - VersaTREK Myco PVNA, contenente polimixina B, acido nalidixico, amfotericina B e vancomicina;
- VersaTREK Myco GS: supplemento di crescita, costituito da sieroalbumina bovina, destrosio, acido oleico, catalasi e cloruro di sodio, da conservare a temperatura ambiente in luogo protetto dalla luce;

- Connettore monouso.

Procedimento:

- i flaconi vengono inoculati con 0,5-1 mL di campione decontaminato.

Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD;

- i flaconi inoculati sono caricati nello strumento dove vengono lasciati per 6 settimane, o fino alla comparsa di positività, a una temperatura di 35 °C. Su tutti i flaconi positivi deve essere eseguito un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti e, contestualmente, una semina su agar cioccolato;
- al termine dell'incubazione è buona regola esaminare visivamente tutti i flaconi da scartare per individuare l'eventuale presenza di torbidità o di granuli che potrebbero indicare una crescita non rilevata dallo strumento. In quest'ultimo caso deve essere eseguito un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti.

Il tempo medio di crescita (54, 62-63) è, per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia positiva, 14,8 giorni (range 2,5-34); per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia negativa, 21,6 giorni (range 3-39); per micobatteri non tubercolari, 24,2 giorni (range 15-34); per *Mycobacterium avium* complex 10,2 giorni (range 4-16).

Caratteristiche del sistema:

Il sistema è completamente automatico, non radiometrico, esegue un monitoraggio continuo della crescita, è dotato di gestione computerizzata dei dati ed è adatto per ogni tipo di materiale, compresi i campioni ematici. Può essere usato anche per l'esecuzione del saggio di farmaco-sensibilità.

Non è possibile l'incubazione a temperature differenziate. Utilizza aghi per le procedure di inoculo. Questa procedura, oltre ad essere pericolosa per l'operatore, è causa di difficoltà di inoculo in presenza di materiale non finemente omogeneizzato.

7.3.2.2.5. BACTEC 9000 MB**Principio:**

Il sistema BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson) è automatico, e permette la coltura per micobatteri da tutti i materiali compreso il sangue. Questo sistema utilizza il brodo Middlebrook 7H9 modificato con l'aggiunta di idrolisato di caseina, citrato ferrico di ammonio, glicerolo e Tween 80. Al flacone così composto deve essere addizionata una miscela di antibiotici per eliminare la crescita dei contaminanti. Il sistema rivela i cambiamenti nella concentrazione di O₂. Ogni flacone contiene un disco di silicone impregnato con un sale di rutenio che si comporta da sensore ossigeno-specifico.

L'elevato contenuto iniziale di O₂ nel flacone inattiva la fluorescenza, ma il consumo di O₂ operato dai microrganismi durante la crescita determina la comparsa di fluorescenza quando la bottiglia è esposta a raggi ultravioletti. La positività è segnalata tramite allarmi visivo e acustico (fig. 7.10).

Reagenti:

- Flaconi Myco/F Sputa. Il *medium* (40 mL) è una variante del brodo Middlebrook 7H9;
- Supplemento PANTA/F. Miscela di antibiotici liofilizzati comprendente polimixina B, amfotericina B, acido nalidixico, trimetoprim e azlocillina;
- *Supplement/F*. Arricchimento contenente albumina bovina, destrosio, poliossietilene stearato, catalasi e acido oleico.

Procedimento:

- i flaconi vengono inoculati con 0,5-1 mL di campione decontaminato o, per i materiali prove-

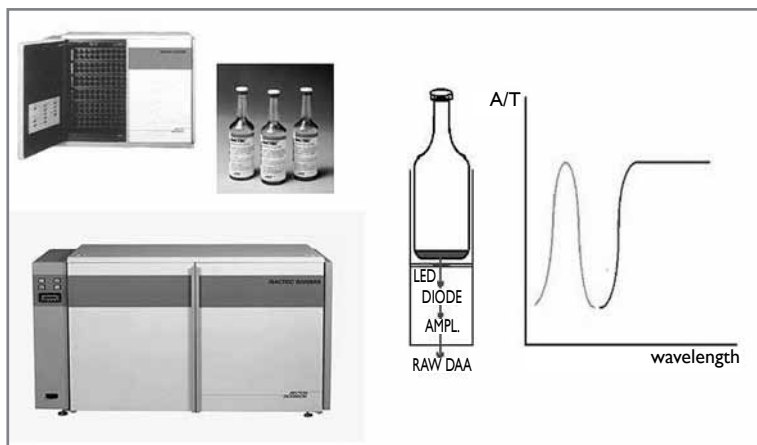


Fig. 7.10. SISTEMA
BACTEC 9000 MB.

nienti da siti sterili, semplicemente concentrato.

Per i particolari si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD;

- i flaconi inoculati sono caricati nello strumento, dove vengono lasciati, a una temperatura di 37 °C, per 6 settimane o fino alla comparsa di positività. Lo strumento, ogni dieci minuti, esegue un ciclo di agitazione della durata di 60 secondi;
- su tutti i flaconi positivi deve essere eseguito un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti e, contestualmente, una semina su agar cioccolato.

Il tempo medio di crescita (37, 57, 64) è: per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia positiva, 10,6 giorni (range 2-34); per *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni con microscopia negativa, 16,5 giorni (range 1-42); per i micobatteri non tubercolari, 15,1 giorni (range 3-39) e, per *Mycobacterium avium* complex, 10,8 giorni (range 3-39).

Caratteristiche del sistema:

Il sistema è completamente automatico, non radiometrico, non invasivo, esegue un monitoraggio continuo della crescita e consente la gestione computerizzata dei dati. È adatto a ogni tipo di materiale, compresi i campioni ematici. Non è possibile l'incubazione di flaconi a temperature diverse da 37 °C.

Il sistema non è utilizzabile per eseguire il test di sensibilità ai farmaci.

7.3.3. CONTROLLO QUALITÀ

La fertilità di ciascun lotto di terreno impiegato dai sistemi automatici sopra illustrati deve essere controllata con un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294), uno di *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478) e uno di *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841).

7.4. PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ

I laboratori che eseguono la diagnostica micobatteriológica sono tenuti a partecipare a un programma esterno di qualità per ogni aspetto della diagnostica erogata. Fra i programmi di *proficiency* disponibili in commercio, i seguenti valutano le performance delle metodiche impiegate per la col-

tura dei micobatteri:

- Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), <http://www.instand-ev.de>, spedisce 10 campioni all'anno recapitati in due invii. I tempi di risposta sono abbastanza ristretti (un mese) e richiedono la sola *detection* (positiva o negativa), mentre l'identificazione è opzionale;
- UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (NEQAS), London (UK), <http://www.ukneqasmicro.org.uk>, è distribuito in Italia da Oxoid. Il programma NEQAS invia 4 campioni 3 volte l'anno, è necessario identificare il micobatterio isolato e segnalare il tempo di crescita; la *deadline* per l'invio delle risposte è di circa 3 mesi.

L'abbonamento ai suddetti programmi fornisce un servizio con le seguenti caratteristiche: a) istruzioni complete per la ricostituzione e preparazione dei campioni che debbono essere trattati come normali campioni clinici; b) valutazione statistica dei risultati con relativo punteggio; c) garanzia dell'anonimato; d) invio di un certificato di partecipazione.

In tempi recenti sono stati attivati anche programmi di VEQ a livello di alcune regioni (Emilia Romagna, Lombardia, Toscana).

7.5. EMOCOLTURA

Poiché i micobatteri quando sono presenti nel sangue lo sono in bassa carica e in maniera intermittente (14), il sangue non può essere considerato il materiale di elezione per diagnosticare un'infezione da micobatteri. È perciò importante che la richiesta di emocoltura sia basata su fondati sospetti clinici. La sepsi da micobatteri tubercolari è comunemente associata a tubercolosi miliare, mentre le sepsi da micobatteri non tubercolari sono più frequenti in corso di AIDS o comunque in presenza di grave compromissione del sistema immunitario (6, 35). Le specie più frequentemente isolate appartengono, in ordine di frequenza, a *Mycobacterium avium* complex (20) e a *Mycobacterium tuberculosis* complex (18).

Accanto al classico prelievo ematico mediante puntura venosa può essere praticata una mielocoltura e, nel caso di sospetta tubercolosi dell'apparato genitale femminile, la coltura del sangue mestruale.

Il prelievo può essere eseguito direttamente in flaconi dedicati se il laboratorio dispone dello strumento automatico specifico. È anche possibile utilizzare, per il prelievo, normali provette sterili con SPS (sodio polianethol sulfonato) o con eparina; non è accettabile l'EDTA (acido etilen-diamino-tetra-acetico), che è un potente inibitore della crescita dei micobatteri. Il sangue così prelevato va trasferito in laboratorio nei flaconi dedicati.

In alternativa dovrebbe essere usato il sistema ISOLATOR per la lisi-centrifugazione; questo permette l'inoculo di qualsiasi tipo di terreno, liquido e solido.

Se i campioni di sangue non possono essere processati al momento, devono essere conservati a temperatura ambiente (36).

A causa della paucibacillarità dei campioni ematici non è utile l'esecuzione dell'esame microscopico ed è consigliabile prolungare il tempo di incubazione delle colture almeno per 8 settimane, anche nei sistemi i cui protocolli prevedano incubazioni più brevi. Nel caso di pazienti con AIDS o con grave compromissione del sistema immunitario, nel sospetto di infezione da *Mycobacterium*

genavense, è consigliabile prolungare i tempi di incubazione anche oltre le 8 settimane.

7.5.1. SISTEMA ISOLATOR. METODO DELLA LISI-CENTRIFUGAZIONE

Principio:

Il sistema (23, 24, 47, 52), commercializzato in Italia da Oxoid, utilizza una provetta contenente una miscela di reagenti in grado di lisare le cellule ematiche senza ledere la vitalità dei micobatteri (fig. 7.11). Il concentrato ottenuto per centrifugazione può essere seminato su tutti i tipi di terreno, sia solidi che liquidi; i terreni liquidi hanno comunque una maggiore sensibilità rispetto a quelli solidi e tempi di crescita più brevi (21). Qualora si utilizzino sistemi di coltura automatici occorre inoculare flaconi di uso generale (cioè BacT/ALERT MP invece di BacT/ALERT MB e Myco/F Sputa invece di Myco/F Lytic), essendo questi ultimi flaconi specificamente destinati alla semina di sangue intero.

Qualora la semina sia eseguita su terreno solido è anche possibile determinare il numero di microrganismi presenti nel sangue, contando le colonie.

I composti presenti nella provetta includono SPS (anticoagulante che sopprime la fagocitosi, neutralizza il complemento, il lisozima e alcuni antibiotici quali gli aminoglicosidi e le polimixine), saponina (in grado di lisare i globuli rossi e i globuli bianchi) e glicole polipropilenico.

Reagenti e accessori:

- Provetta di prelievo-concentrazione (Isolator 10 o Isolator 1.5);
- Pipette dedicate e pressa perforatrice (Isostat Microbial System);
- Centrifuga dedicata con rotore ad angolo fisso.

Procedimento:

- raccogliere, nella provetta Isolator 10, 10 mL di sangue prelevato dalla vena del paziente (1,5 mL nella provetta Isolator 1.5, se si tratta di pazienti pediatrici) e miscelare per inversione;
- centrifugare a 3000 xg per 30 minuti impiegando l'apposita centrifuga;
- applicare il dispositivo di perforazione e, utilizzando l'apposita pressa, perforare il diaframma di gomma;
- introdurre la pipetta più corta e prelevare il supernatante che verrà quindi scartato;
- agitare al vortex la provetta per 10 secondi;
- utilizzando la pipetta più lunga, prelevare l'intero sedimento e seminarlo su idonei terreni di coltura;
- incubare e leggere i terreni di coltura secondo le modalità consuete.

7.5.2. SISTEMI AUTOMATICI CON FLACONI DEDICATI

7.5.2.1. BACTEC 9000 MB

Principio:

Il sistema, automatico, non radiometrico (Becton Dickinson), permette la coltura di micobatteri da sangue (1, 58, 59) utilizzando il terreno BACTEC Myco/F Lytic che non richiede aggiunta di supplemento. Si tratta di un brodo Middlebrook 7H9 modificato con l'aggiunta di saponina, come agente per la lisi ematica, SPS, come anticoagulante, citrato ferrico di ammonio, come sorgente di ferro (necessaria per la crescita di alcuni ceppi di micobatteri), infuso cuore cervello, glicerolo e Tween 80. Il sistema rivela i cambiamenti nella concentrazione di O₂, che viene monitorata dallo



Fig. 7.11. SISTEMA ISOLATOR.

strumento BACTEC 9000 MB ogni 10 minuti (vedi 7.3.2.2.5).

Reagenti:

Flaconi Myco/F Lytic.

Procedimento:

Per le modalità di preparazione e di inoculo dei flaconi si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

- i flaconi, inoculati con 5 mL di sangue, sono caricati nello strumento dove vengono incubati a una temperatura di 35 °C per 6, preferibilmente 8, settimane o fino alla comparsa di positività;
- lo strumento ogni 10 minuti esegue un ciclo di agitazione della durata di 60 secondi;
- su tutti i flaconi positivi deve essere eseguito un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti e, contestualmente, una semina su agar cioccolato;
- al termine del protocollo è buona regola esaminare visivamente tutti i flaconi segnalati come negativi per individuare la presenza di un eventuale rigonfiamento del setto di gomma (indice di accumulo di gas all'interno del flacone, probabilmente dovuto a presenza di crescita batterica). In questo caso è necessario dare sfogo al gas effettuando l'operazione all'interno di una cappa di sicurezza biologica, eseguire dei preparati microscopici per la ricerca di bacilli alcol-acido-resistenti e allestire una o più sub-culture in terreno solido.

I tempi medi di crescita riportati dal produttore sono di 14 giorni per *Mycobacterium avium* complex e di circa 23 giorni per *Mycobacterium tuberculosis* complex.

7.5.2.2. BACT/ALERT 3D

Principio:

Il sistema BacT/ALERT 3D (bioMérieux) è totalmente automatico, non radiometrico (13). Si utilizzano, per le emocolture, flaconi di policarbonato. Il flacone contiene 29 mL di brodo Middlebrook 7H9 arricchito con caseina, glicerolo e SPS come anticoagulante. A questo terreno va aggiunto il liquido di arricchimento contenente sia i componenti necessari a favorire la crescita ottimale dei micobatteri che

un agente per la lisi delle cellule ematiche. I flaconi vengono posti all'interno dello strumento e incubati.

Reagenti:

- Flaconi BacT/ALERT MB: flacone con terreno di coltura da conservare a temperatura di 15-30 °C, al riparo dalla luce diretta;
- MB/BacT *enrichment fluid*: liquido di arricchimento costituito da acido oleico, cloruro di sodio, saponina e sieralbumina bovina, da conservare a temperatura di 15-30 °C, al riparo dalla luce.

Procedimento:

Per le modalità di preparazione e di inoculo dei flaconi si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD. Procedere in questo modo:

- i flaconi, inoculati con 3-5 mL di sangue, sono caricati nello strumento BacT/ALERT 3D dove vengono lasciati, a una temperatura di 35-37 °C, per 6 (preferibilmente 8) settimane o fino alla comparsa di positività;
- su tutti i flaconi positivi occorre eseguire un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti e, contestualmente, una semina su agar cioccolato.

I tempi medi di crescita riportati dal produttore sono, in assenza di agitazione del flacone: per *Mycobacterium tuberculosis*, circa 20 giorni (range compreso tra 13,3 e 30); per *Mycobacterium avium*, circa 12 giorni (range compreso tra 9,2 e 15,7).

7.5.3. CONTROLLO DI QUALITÀ

La fertilità di ciascun lotto di terreno impiegato dai sistemi automatici per emocolture sopra illustrati deve essere controllata con un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294) e uno di *Mycobacterium intracellulare* (ATCC 13950).

7.6. CONTAMINAZIONI E CROSS-CONTAMINAZIONI

La contaminazione dei campioni e la cross-contaminazione o contaminazione crociata sono due entità nettamente distinte.

Per “contaminazione” si intende la crescita, nella coltura, di microrganismi diversi dai micobatteri. Tale contaminazione può dipendere dal campione, che non è stato possibile decontaminare completamente, dall'utilizzo di reagenti contaminati o da manovre errate dell'operatore. Il problema della contaminazione delle colture in un laboratorio di micobatteriologia è indipendente dal sistema di coltura utilizzato.

Totalmente diverso è il problema delle cross-contaminazioni di laboratorio che si verificano quando, durante la processazione, una coltura viene contaminata da micobatteri provenienti da un campione (positivo) diverso da quello inoculato.

7.6.1. CONTROLLO DELLE CONTAMINAZIONI

Per tenere sotto controllo le contaminazioni, in ogni seduta lavorativa può essere incluso un controllo negativo costituito da acqua o tampone sterili. Il controllo deve essere processato insieme ai campioni clinici e inoculato negli stessi terreni. Il campione deve rimanere negativo fino al termine del protocollo di incubazione. Nel caso di comparsa di positività per bacilli alcol-acido-

resistenti devono essere invalidati tutti i risultati di quel *batch* di campioni. In tal caso, come anche in presenza di contaminazione da flora microbica aspecifica, devono essere introdotte o verificate le seguenti misure correttive (7):

- revisione approfondita di tutte le procedure;
- controllo della sterilità di tutti i reagenti o preparazione di nuovi reagenti;
- disinfezione delle cappe biologiche di sicurezza.

7.6.2. INDICATORI DI CROSS-CONTAMINAZIONE

Quando si sospetti la presenza di una contaminazione crociata è raccomandato il ricorso a tecniche di tipizzazione molecolare (49), che sono in grado di accertare l'eventuale identità dei ceppi.

I seguenti riscontri laboratoristici debbono costituire un serio campanello di allarme per far ipotizzare la presenza di contaminazione crociata:

- aumento della percentuale di colture positive, specialmente a carico di micobatteri non tubercolari, rispetto a quanto normalmente osservato in laboratorio;
- isolamento di una stessa specie da campioni di pazienti diversi processati in una stessa seduta;
- positività colturale di un campione microscopico-negativo (processato immediatamente dopo uno microscopico-positivo) per il quale non esista un valido sospetto clinico;
- isolamento in più colture, processate nella stessa seduta e provenienti da pazienti diversi, di micobatteri con un identico specifico pattern di farmaco-resistenza.

7.6.3. MISURE DI PREVENZIONE DELLE CROSS-CONTAMINAZIONI

Per minimizzare il rischio di contaminazioni crociate:

- tutti i reagenti devono essere aliquotati in base al carico di lavoro giornaliero; ciò che rimane deve essere eliminato o risterilizzato prima di essere nuovamente utilizzato;
- i tubi con i campioni devono essere distanziati nel portaprovette;
- i tubi devono essere aperti uno alla volta e tenuti aperti per il tempo strettamente necessario all'aggiunta dei supplementi e all'inoculo del campione in esame;
- i tappi, una volta rimossi, devono essere appoggiati all'interno della cappa di sicurezza, su una garza intrisa di ipoclorito di sodio al 10%, con l'apertura rivolta verso il basso;
- tutte le aggiunte di qualsivoglia sostanza devono essere fatte prima dell'inoculo del campione da processare;
- durante l'aggiunta di reagenti o altre manipolazioni occorre evitare il contatto fra il contenitore del reagente, o la pipetta, e il bordo del tubo del campione;
- deve essere evitata la formazione di schizzi durante l'aggiunta del campione al tubo contenente i reagenti o durante la decantazione successiva alla centrifugazione;
- occorre aspettare circa 5 minuti prima di aprire un tubo dopo averlo agitato al vortex.

7.7. REFERTAZIONE

In caso di negatività refertare: "Negativa la coltura di micobatteri".

In caso di positività refertare: "Positiva la crescita di bacilli alcol-acido-resistenti. Identificazione

in corso”.

La refertazione delle colture positive deve essere fatta non appena si rileva crescita sul primo dei terreni seminati, di solito il terreno liquido. L'incubazione dell'altro terreno (solitamente quello solido) va comunque prolungata fino al momento della comparsa di positività o fino al termine del periodo di incubazione.

Generalmente il numero delle colonie cresciute su terreno solido correla con il numero dei bacilli alcol-acido-resistenti presenti all'esame microscopico. La quantificazione delle colonie e/o il tempo di positivizzazione possono aiutare a valutare sia l'estensione della malattia che la risposta alla terapia (7) (tab. 2).

La contaminazione di una coltura deve essere segnalata quanto prima al clinico, per l'eventuale invio di un nuovo campione.

Numero di colonie in terreno solido	Referto
Nessuna colonia	Negativa la coltura per micobatteri
<50 colonie	Riportare il numero di colonie contate
50-100 colonie	1 +
100-200 colonie	2 +
200-500 colonie	3 +
>500 colonie	4 +

BIBLIOGRAFIA

1. Archibald L.K., McDonald L.C., Addison R.M., McKnight C., Byrne T., Dobbie H., Nwanyanwu O., Kazembe P., Reller L.B., Jarvis W.R., *Comparison of Bactec Myco/F Lytic and Wampole Isolator 10 (Lysis-Centrifugation) systems for detection of bacteremia, mycobacteremia, and fungemia in a developing country*, 2000, *J Clin Microbiol*; 38:2994-2997.
2. Badak F.Z., Kiska D.L., Setterquist S., Hartley C., O'Connell M.A., Hopfer R.L., *Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens*, 1996, *J Clin Microbiol*; 34:2236-2239.
3. Bange F.C., Bottger E.C., *Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis*, 2002, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 21:546-548.
4. Bange F.C., Kirschner P., Böttger E.C., *Recovery of mycobacteria from patients with cystic fibrosis*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:3761-3763.
5. Beam R.E., Kubica G.P., *Stimulatory effects of carbon dioxide on the primary isolation of tubercle bacilli on agar containing medium*, 1968, *Am J Clin Pathol*; 50:395-397.
6. Bouza E., Diaz Lopez M.D., Moreno S., Dequiros J.C.L.B., Vicente T., Berenguer J., *Mycobacterium tuberculosis bacteremia in patients with and without human immunodeficiency virus infection*, 1993, *Arch Intern Med*; 153:496-500.
7. CLSI, *Laboratory detection and identification of mycobacteria; proposed guideline*, 2007, CLSI, Forbes, BA.
8. Cambau E., Wichlacz C., Truffot-Pernot C., Jarlier V., *Evaluation of the new MB Redox system for detection of growth of mycobacteria*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:213-215.
9. Cernoch P.L., Enns R.K., Saubolle M.A., Wallace R.J. Jr., Cumitech 16A, *Laboratory diagnosis of the mycobacterioses*. Washington DC, Weissfeld AS, 1994.
10. Chang C.L., Park T.S., Oh S.H., Kim H.H., Lee E.Y., Son H.C., Kim C.M., *Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes with a modified antimicrobial combination*, 2002, *J Clin Microbiol*; 40:3845-3847.
11. Cornfield D.B., Beavis K.G., Greene J.A., Bojak M., Bondi J., *Mycobacterial growth and bacterial contamination in the Mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture system*, 1997, *J Clin Microbiol*; 35:2068-2071.
12. Cruciani M., Scarparo C., Malena M., Bosco O., Serpelloni G., Mengoli C., *Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria*, 2004, *J Clin Microbiol*; 42:2321-2325.
13. Crump J.A., Tanner D.C., Mirrett S., McKnight C.M., Reller L.B., *Controlled comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and Isolator 10 systems for detection of mycobacteremia*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:1987-1990.
14. David S.T., Mukundan U., Brahmadathan K.N., John T.J., *Detecting mycobacteria for diagnosing tuberculosis*, 2004, *Indian J Med Res*; 119:259-266.
15. Della-Latta P., *The mycobacteriology milestones*, 1999, *Lab Med*; 30:408-417.

16. Gil-Setas A., Torroba L., Fernandez J.L., Martinez-Artola V., Olite J., *Evaluation of the MB/BacT system compared with Middlebrook 7H11 and Lowenstein-Jensen media for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens*, 2004, *Clin Microbiol Infect*; 10:224-228.
17. Hanna B.A., Ebrahimzadeh A., Elliott L.B., Morgan M.A., Novak S.M., Rüsck-Gerdes S., Acio M., Dunbar D.F., Holmes T.M., Rexer C.H., Savthyakumar C., Vannier A.M., *Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:748-752.
18. Havlik J.A. Jr., Horsburgh C.R. Jr., Metchock B., Williams P.P., Fann S.A., Thompson S.E. III, *Disseminated Mycobacterium avium complex infection: clinical identification and epidemiologic trends*, 1992, *J Infect Dis*; 165:277-580.
19. Heifets L., Linder T., Sanchez T., Spencer D., Brennan J., *Two liquid medium systems, Mycobacteria Growth Indicator Tube and MB Redox tube, for Mycobacterium tuberculosis isolation from sputum specimens*, 2000, *J Clin Microbiol*; 38:1227-1230.
20. Horsburgh C.R. Jr., *Mycobacterium avium complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome*, 1991, *N Engl J Med*; 324:1332-1338.
21. Jacomo V., Musso D., Gevaudan M.J., Drancourt M., *Isolation of blood-borne Mycobacterium avium by using the nonradioactive BACTEC 9000 MB system and comparison with a solid-culture system*, 1998, *J Clin Microbiol*; 36:3694-3697.
22. Kent P.T., Kubica G.P., *Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory*, 1985, Atlanta, US Department of Health and Human Services.
23. Kiehn T.E., Edwards F.F., Brannon P., Tsang A.Y., Maio M., Gold J.W.M., Whimbley E., Wong B., McClatchy J.K., Armstrong D., *Infections caused by Mycobacterium avium complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and seroagglutination characteristics*, 1985, *J Clin Microbiol*; 21:168-173.
24. Kiehn T.E., Gold J.W.M., Brannon P., Timberger R.J., Armstrong D., *Mycobacterium tuberculosis bacteraemia detected by the Isolator lysis-centrifugation blood culture system*, 1985, *J Clin Microbiol*; 21:647-648.
25. Kubica G.P., Dye W.E., Cohen M.L., Middlebrook G., *Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine sodium hydroxide for culture of mycobacteria*, 1963, *Am Rev Respir Dis*; 87:775-779.
26. Kubica G.P., Kaufmann A.J., Dye W.E., *Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria*, 1964, *Am Rev Respir Dis*; 89:284-286.
27. LaBombardi V., *VersaTREK (ESP Culture System II)*, in: Isenberg H.D. Ed., *Clinical microbiology procedure handbook*, 2004, Washington DC, American Society for Microbiology; 7.4.3.
28. Lee L.V., *Neurotuberculosis among Filipino children: an 11 years experience at the Philippine Children's Medical Center*, 2000, *Brain Dev*; 22:469-474.
29. Leitritz L., Schubert S., Bücherl B., Masch A., Heesemann J., Roggenkamp A., *Evaluation of Bactec MGIT 960 and Bactec 460TB systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis*, 2001, *J Clin Microbiol*; 39:3764-3767.
30. Liu Y.C., Huang T.S., Huang W.K., *Comparison of a nonradiometric liquid-medium method (MB REDOX) with the BACTEC system for growth and identification of mycobacteria in clinical specimens*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:4048-4050.

31. McClatchy J.K., Waggoner R.F., Kanes W., Cernick M.S., Bolton T.L., *Isolation of mycobacteria from clinical specimens by use of selective 7H11 medium*, 1976, *Am J Clin Pathol*; 65:412-415.
32. Middlebrook G., Reggiardo Z., Tigert W.D., *Automatable radiometric detection of growth of Mycobacterium tuberculosis in selective media*, 1977, *Am Rev Respir Dis*; 115:1066-1069.
33. Naumann L., Jaeger H., Lang E., Lehn N., Linde H.J., Oros H., Pausch G., Poppinger J., Schwarz A., Vilsmeier S., Reischl U., *Evaluation of MB Redox - Comparison of a new liquid medium with solid media and the BACTEC 460*, 1997, *J Lab Med*; 21:31-34.
34. Nolte F.S., Metchock B., Mycobacterium, in: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. Eds., *Manual of clinical microbiology*, 1995, ASM Press, Washington DC; 400-437.
35. Palacios E., Alcalá L., Ruiz-Serrano M.J., de Viedma D.G., Rodriguez-Creixems M., Marin-Arriaza M., Berenguer J., Bouza E., *Evaluation of bone marrow and blood cultures for the recovery of mycobacteria in the diagnosis of disseminated mycobacterial infections*, 2004, *Clin Microbiol Infect*; 10:734-737.
36. Pfyffer G.E., Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr., Mycobacterium: general characteristics, isolation, and staining procedures, in: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover R.H. Eds., *Manual of clinical microbiology*, 2003, ASM Press, Washington DC; 532-559.
37. Pfyffer G.E., Cieslak C., Welscher H.M., Kissling P., Rüscher-Gerdes S., *Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid culture systems*, 1997, *J Clin Microbiol*; 35:2229-2234.
38. Pfyffer G.E., Welscher H.M., Kissling P., Cieslak C., Casal M.J., Gutierrez J., Rüscher-Gerdes S., *Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli*, 1997, *J Clin Microbiol*; 35:364-368.
39. Piersimoni C., Scarparo C., Callegaro A., Passerini Tosi C., Nista D., Bornigia S., Scagnelli M., Rigon A., Ruggiero G., Goglio A., *Comparison of MB/BacT ALERT 3D System with radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study*, 2001, *J Clin Microbiol*; 39:651-657.
40. Piersimoni C., Scarparo C., Cichero P., Del Pezzo M., Covelli I., Gesu G., Nista D., Scagnelli M., Mandler F., *Multicenter evaluation of the MB-redox medium compared with radiometric BACTEC system, mycobacteriagrowth indicator tube (MGIT), and Lowenstein-Jensen medium for detection and recovery of acid-fast bacilli*, 1999, *Diagn Microbiol Infect Dis*; 34:293-299.
41. Ratnam S., March S.B., *Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens*, 1986, *J Clin Microbiol*; 23:582-585.
42. Roberts G.D., Hall L., Wolk D.M., Mycobacteria, in: Truant A.L. Ed., *Manual of commercial methods in clinical microbiology*, 2002, ASM, Washington DC; 256-273.
43. Roggenkamp A., Hofner M.W., Masch A., Aigner B., Autenrieth I.B., Heesemann J., *Comparison of MB/BacT and Bactec 460 TB systems for recovery of mycobacteria in a routine diagnostic laboratory*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:3711-3712.
44. Rohner P., Ninet B., Metral C., Emler S., Auckenthaler R., *Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens*, 1997, *J Clin Microbiol*; 35:3127-3131.

45. Samra Z., Kaufmann L., Zeharia A., Ashkenazi S., Amir J., Bahar J., Reischl U., Naumann L., *Optimal detection and identification of Mycobacterium haemophilum in specimens from pediatric patients with cervical lymphadenopathy*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:832-834.
46. Saragias M., *BACTEC MGIT 960 automated system*, in: Isenberg H.D. Ed., *Clinical microbiology procedure handbook*, 2004, ASM, Washington DC; 7.4.22.
47. Saragias M., *Wampole ISOLATOR tube*, in: Isenberg H.D. Ed., *Clinical microbiology procedure handbook*, 2004, Washington DC, American Society for Microbiology; 7.4.5.
48. Siddiqi S., *BACTEC 460TB radiometric system*, in: Isenberg H.D. Ed., *Clinical microbiology procedure handbook*, 2004, Washington DC, American Society of Microbiology; 7.4.1.
49. Small P.M., van Embden J.D.A., *Molecular epidemiology of tuberculosis*, in: Bloom BR. Ed., *Tuberculosis. Pathogenesis, protection, and control*, 1994, ASM Press, Washington DC; 569-82.
50. Smithwick R.W., *Laboratory manual for acid-fast microscopy*, 1976, Atlanta, Centers for Disease Control.
51. Somoskövi Á., Magyar P., *Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with MB Redox, Löwenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:1366-1369.
52. Stockman L., *Blood culture for mycobacteria: Isolator method*, in: Isenberg H.D. Ed., *Clinical microbiology procedures handbook*, 1992, Washington, American Society for Microbiology; 3.9.1-3.9.5
53. Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburgh C.R., Good R.C., *The resurgence of tuberculosis, Is your laboratory ready?*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:767-770.
54. Tortoli E., Cichero P., Chirillo M.G., Gismondo M.R., Bono L., Gesu G., Simonetti M.T., Volpe G., Nardi G., Marone P., *Multicenter comparison of ESP Culture System II with BACTEC 460TB and with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens, including blood*, 1998, *J Clin Microbiol*; 36:1378-1381.
55. Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti M.T., Gesu G., Nista D., *Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study*, 1999, *J Clin Microbiol*; 37:3578-3582.
56. Tortoli E., Mandler F., Tronci M., Penati V., Sbaraglia G., Costa D., Montini G., Predominato M., Riva R., Passerini Tosi C., Piersimoni C., Urbano P., *Multicenter evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with the BACTEC radiometric method, BBL biphasic growth medium and Löwenstein-Jensen medium*, 1997, *Clin Microbiol Infect*; 3:468-473.
57. van Griethuysen A.J., Jansz A.R., Buiting A.G.M., *Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB system, Septi-Chek AFB system, and Lowenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria*, 1996, *J Clin Microbiol*; 34:2391-2394.
58. Vetter E., Torgerson C., Feuker A., Hughes J., Harmsen S., Schleck C., Horstmeier C., Roberts G., Cockerill F. III., *Comparison of the BACTEC MYCO/F Lytic bottle to the isolator tube, BACTEC Plus Aerobic F/bottle, and BACTEC Anaerobic Lytic/10 bottle and comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/bottle to the Isolator tube for recovery of bacteria, mycobacteria, and fungi from blood*, 2001, *J Clin Microbiol*; 39:4380-4386.
59. Waite R.T., Woods G.L., *Evaluation of BACTEC MYCO/F lytic medium for recovery of mycobacteria and fungi from blood*, 1988, *J Clin Microbiol*; 26:1176-1179.
60. Welch D.F., Guruswamy A.P., Sides S.J., Shaw C.H., Gilchrist M.J.R., *Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:2178-2184.

61. Whittier S., Hopfer R.L., Knowles M.R., Gilligan P.H., *Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:861-864.
62. Williams-Bouyer N., Yorke R., Lee H.I., Woods G.L., *Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture System II for growth and detection of mycobacteria*, 2000, *J Clin Microbiol*; 38:4167-4170.
63. Woods G.L., Fish G., Plaunt M., Murphy M., *Clinical evaluation of Difco ESP Culture System II for growth and detection of mycobacteria*, 1997, *J Clin Microbiol*; 35:121-124.
64. Zanetti S., Ardito F., Sechi L., Sanguinetti M., Molicotti P., Delogu G., Pinna M.P., Nacci A., Fadda G., *Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples*, 1997, *J Clin Microbiol*; 35:2072-2075.

Capitolo 8

IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI

Enrico Tortoli

8. IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI

È indispensabile giungere all'identificazione di tutti i micobatteri cresciuti in coltura, poiché tale informazione è cruciale per diagnosi e terapia. I laboratori che non eseguono l'identificazione devono inviare gli isolati a un Centro di Riferimento. Un'identificazione a livello di raggruppamento di specie è accettabile per i micobatteri facenti parte del *Mycobacterium tuberculosis* complex, del *Mycobacterium avium* complex, del *Mycobacterium terrae* complex.

Di fondamentale importanza dal punto di vista clinico e terapeutico è la differenziazione, che deve essere effettuata nel più breve tempo possibile, tra micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex e micobatteri non tubercolari (MNT).

In presenza di colonie pigmentate o di micobatteri a crescita rapida l'appartenenza al *Mycobacterium tuberculosis* complex può essere esclusa direttamente ancor prima di ricorrere a qualsiasi approccio identificativo. L'uso di sonde molecolari (DNA-probe) è, fra i metodi a larga diffusione, quello più affidabile per stabilire l'appartenenza di un ceppo al *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Un'identificazione a livello di specie, all'interno del *Mycobacterium tuberculosis* complex, che dovrebbe essere eseguita almeno nei Centri di Riferimento, può a sua volta essere raggiunta impiegando sonde molecolari o test biochimici (niacina e nitrati) (5).

Per l'identificazione delle specie diverse da *Mycobacterium tuberculosis* possono essere impiegati un pannello di test biochimico-colturali (5), l'analisi cromatografica dei lipidi della parete, i DNA probe (limitatamente alle specie per cui sono disponibili), la PCR restriction analysis (PRA) o il sequenziamento genico.

8.1. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE TEST BIOCHIMICO-COLTURALI

L'utilizzo dei test biochimico-colturali per l'identificazione delle varie specie di micobatteri è stato quasi completamente abbandonato, infatti l'elevato numero di specie attualmente conosciute richiederebbe, per la differenziazione, l'esecuzione di un numero insostenibile di test. Inoltre i test per i quali sono conosciuti i risultati attesi relativamente alle singole specie rappresentano un'esigua minoranza. Questo non significa comunque che l'uso dei test biochimico-colturali porti invariabilmente a identificazioni errate o non possa essere di utilità. Il loro impiego porta quasi sempre all'attribuzione del microrganismo in esame a una delle specie (una trentina) di più frequente isolamento. L'identificazione ottenuta sarà pertanto corretta in un buon numero di casi, ma non potrà che essere errata tutte le volte che ci troveremo di fronte a micobatteri appartenenti a specie meno frequenti. Gli unici test biochimici che hanno ancora un largo impiego nella routine di laboratorio sono quelli che permettono di riconoscere, nell'ambito del *Mycobacterium tuberculosis* complex, i ceppi di *Mycobacterium tuberculosis*. La presente trattazione sarà quindi limitata a questi test.

Alcune caratteristiche colturali, quali velocità di crescita, morfologia e pigmentazione delle colonie, devono comunque essere sempre indagate, qualsiasi sia l'approccio identificativo adottato, e la loro compatibilità con l'identificazione ottenuta è assai importante per valutare l'attendibilità di quest'ultima (tab. I).

Tab. I - CARATTERI FENOTIPICI DELLE SPECIE MICOBATTERICHE UFFICIALMENTE RICONOSCIUTE (AL 31 LUGLIO 2012)^a.

Specie a crescita rapida		Specie a crescita lenta	
<i>M. abscessus</i>	N	<i>M. algericum</i>	N
<i>M. agri</i>	N	<i>M. arosiense</i>	S
<i>M. aichiense</i>	S	<i>M. arupensee</i>	N
<i>M. alvei</i>	N	<i>M. asiaticum</i>	F
<i>M. aromaticivorans</i>	S	<i>M. avium</i>	N
<i>M. aubagnense</i>	N	<i>M. bohemicum</i>	S
<i>M. aurum</i>	S	<i>M. botniense</i>	S
<i>M. austroafricanum</i>	S	<i>M. bouchedurhonense</i>	N
<i>M. bacteremicum</i>	S	<i>M. branderi</i>	N
<i>M. boenickei</i>	N	<i>M. celatum</i>	S
<i>M. brisbanense</i>	S	<i>M. chimaera</i>	N
<i>M. brumae</i>	N	<i>M. colombiense</i>	N
<i>M. canariense</i>	N	<i>M. conspicum</i>	S
<i>M. chelonae</i>	N	<i>M. cookii</i>	S
<i>M. chitae</i>	N	<i>M. doricum</i>	S
<i>M. chlorophenolicum</i>	S	<i>M. europaeum</i>	S
<i>M. chubuense</i>	S	<i>M. farcinogenes</i>	S
<i>M. conceptionense</i>	N	<i>M. flavescens</i>	S
<i>M. confluentis</i>	N	<i>M. florentinum</i>	N
<i>M. cosmeticum</i>	S	<i>M. fragae</i>	N
<i>M. crocinum</i>	S	<i>M. gastris</i>	N
<i>M. diernhoferi</i>	N	<i>M. genavense</i>	N
<i>M. duvalii</i>	S	<i>M. gordonae</i>	S
<i>M. elephantis</i>	S	<i>M. haemophilum</i>	N
<i>M. engbaekii</i>	S	<i>M. heckeshornense</i>	S
<i>M. fallax</i>	N	<i>M. heidelbergense</i>	N
<i>M. fluoranthenvivorans</i>	S	<i>M. heraklionense</i>	N
<i>M. fortuitum</i>	N	<i>M. hiberniae</i>	S
<i>M. frederiksbergense</i>	S	<i>M. interjectum</i>	S
<i>M. gadium</i>	S	<i>M. intermedium</i>	S
<i>M. gilvum</i>	S	<i>M. intracellulare</i>	N
<i>M. goodii</i>	S	<i>M. kansasii</i>	F
<i>M. hassiacum</i>	S	<i>M. koreense</i>	N
<i>M. hodleri</i>	S	<i>M. kubicae</i>	S

SEGUE →

Specie a crescita rapida		Specie a crescita lenta	
<i>M. holsaticum</i>	N	<i>M. kumamotoense</i>	N
<i>M. houstonense</i>	N	<i>M. kyorinense</i>	N
<i>M. immunogenum</i>	N	<i>M. lacus</i>	N
<i>M. insubricum</i>	N	<i>M. lentiflavum</i>	S
<i>M. iranicum</i>	S	<i>M. longobardum</i>	N
<i>M. komossense</i>	F	<i>M. malmoense</i>	N
<i>M. litorale</i>	S	<i>M. mantenii</i>	S
<i>M. llatzerense</i>	N	<i>M. marinum</i>	F
<i>M. madagascariense</i>	S	<i>M. marseillense</i>	N
<i>M. mageritense</i>	N	<i>M. minnesotense</i>	F
<i>M. moriokaense</i>	N	<i>M. monacense</i>	S
<i>M. mucogenicum</i>	N	<i>M. montefiorensis</i>	N
<i>M. murale</i>	S	<i>M. nebraskense</i>	S
<i>M. neoaurum</i>	S	<i>M. nonchromogenicum</i>	N
<i>M. neworleansense</i>	N	<i>M. noviomagensis</i>	N
<i>M. novocastrensis</i>	F	<i>M. palustre</i>	S
<i>M. obuense</i>	S	<i>M. paraffinicum</i>	N
<i>M. pallens</i>	F	<i>M. parakorensis</i>	N
<i>M. parafortuitum</i>	S	<i>M. parascrofulaceum</i>	S
<i>M. peregrinum</i>	N	<i>M. paraseoulense</i>	S
<i>M. phlei</i>	S	<i>M. parmense</i>	S
<i>M. phocaicum</i>	N	<i>M. pseudoshottsii</i>	S
<i>M. porcinum</i>	N	<i>M. riyadhense</i>	N
<i>M. poriferae</i>	S	<i>M. saskatchewanense</i>	S
<i>M. psychrotolerans</i>	S	<i>M. scrofulaceum</i>	S
<i>M. pulveris</i>	N	<i>M. senuense</i>	N
<i>M. pyrenivorans</i>	S	<i>M. seoulense</i>	N
<i>M. rhodesiae</i>	S	<i>M. sherrisii</i>	N
<i>M. rufum</i>	S	<i>M. shimoidei</i>	N
<i>M. rutilum</i>	F	<i>M. shinjukuense</i>	N
<i>M. salmoniphilum</i>	N	<i>M. shottsii</i>	N
<i>M. senegalense</i>	N	<i>M. simiae</i>	F
<i>M. septicum</i>	N	<i>M. stomatepiae</i>	N
<i>M. setense</i>	N	<i>M. szulgai</i>	S
<i>M. smegmatis</i>	N	<i>M. terrae</i>	N
<i>M. sphagni</i>	S	<i>M. timonense</i>	S

SEGUE →

Specie a crescita rapida		Specie a crescita lenta	
<i>M. thermoresistibile</i>	S	<i>M. triplex</i>	N
<i>M. tokaiense</i>	S	<i>M. triviale</i>	N
<i>M. vaccae</i>	S	<i>M. tuberculosis</i> complex	N
<i>M. vanbaalenii</i>	S	<i>M. tusciae</i>	S
<i>M. wolonskyi</i>	N	<i>M. ulcerans</i>	N
		<i>M. vulneris</i>	S
		<i>M. xenopi</i>	S
		<i>M. yongonense</i>	N

^a F, pigmento fotoindotto (micobatterio fotocromogeno); N, pigmento non presente (micobatterio non cromogeno); S, pigmento non fotoindotto (micobatterio scotocromogeno).

8.1.1. RILEVAMENTO DELLE CARATTERISTICHE DELLE COLONIE

Velocità di crescita, morfologia e pigmentazione delle colonie sono caratteri fenotipici di notevole importanza per orientare un'identificazione preliminare dei micobatteri.

Delle colonie cresciute in coltura vanno perciò attentamente valutate:

- la velocità di crescita: distinta in minore o maggiore di 7 giorni;
- la morfologia: le colonie possono presentarsi lisce, rugose, trasparenti, opache, a margini netti, a margini frastagliati;
- la presenza di più tipi morfologici: ciascuno da identificare autonomamente;
- la pigmentazione: è importante distinguere, in presenza di pigmento, se questo venga prodotto solo in presenza, o anche in assenza, di luce. Si possono così distinguere:
 - micobatteri non cromogeni (assenza di pigmento);
 - micobatteri fotocromogeni (presenza di pigmento fotoindotto);
 - micobatteri scotocromogeni (presenza di pigmento non fotoindotto).

Di ciascun tipo di colonie isolate devono essere verificate sempre, con un preparato microscopico, la alcol-acido-resistenza e la purezza; a tale fine non possono essere impiegate le colorazioni che usano fluorocromi, bensì vanno utilizzati i coloranti a base di carbolfucsina che evidenziano in maniera ottimale le caratteristiche morfologiche dei micobatteri.

Per una migliore visualizzazione della morfologia delle colonie è indicato l'utilizzo di terreni solidi, a base di agar (Middlebrook 7H10 o 7H11), distribuiti in piastra. Le piastre possono così essere osservate, capovolte, al microscopio a piccolo ingrandimento (obbiettivo 10x). In genere sono gli stadi iniziali di sviluppo quelli che forniscono le indicazioni più utili. Su tali terreni le colonie di *Mycobacterium tuberculosis* hanno un aspetto irregolare, con i bacilli che formano cordoni serpeggianti; i margini sono frastagliati e la parte interna granulata. Morfologie particolari sono caratteristiche di *Mycobacterium avium* e di *Mycobacterium xenopi*: colonie rotondeggianti a margini ondulati e centro rilevato, nel primo, e colonie di aspetto stellato nel secondo (fig. 8.1).

8.1.2. DETERMINAZIONE DELLA VELOCITÀ DI CRESCITA E DELLA PRODUZIONE DI PIGMENTO

Reagenti:

- Due tubi di Löwenstein-Jensen.

Procedimento:

- Inoculare due tubi di Löwenstein-Jensen, ciascuno con 4 gocce di una diluizione 1/1.000 di una sospensione micobatterica avente una torbidità pari allo standard n. 1 della scala McFarland;
- avvolgere uno dei due tubi in carta stagnola per tenerlo al riparo della luce;
- incubare i due tubi a 37 °C (o alla temperatura di crescita ottimale per le specie con esigenze particolari);
- osservare, a intervalli regolari, il terreno non avvolto in carta stagnola fino al momento dello sviluppo di colonie.

Il ceppo è da considerare a crescita rapida se le colonie sono ben visibili entro il settimo giorno di incubazione, a crescita lenta se richiedono più tempo per manifestarsi.

Quando nel tubo incubato alla luce sono visibili colonie ben sviluppate, la carta stagnola può essere rimossa dal secondo tubo. Se le colonie cresciute al buio risultano pigmentate il ceppo è da considerarsi scotocromogeno; in caso contrario la coltura viene incubata *overnight* dopo aver esposto, per qualche ora, le colonie alla luce di una lampada a incandescenza. A questo punto gli stipiti che avranno sviluppato pigmento saranno da considerare fotocromogeni e quelli rimasti non pigmentati, non cromogeni.

8.1.3. TEST BIOCHIMICI

Produzione di niacina e capacità di ridurre i nitrati a nitriti sono caratteristiche di *Mycobacterium tuberculosis*. La positività ad entrambi i test permette di individuare, con buona approssimazione, nell'ambito di *Mycobacterium tuberculosis* complex, i ceppi appartenenti a tale specie.

8.1.3.1. ACCUMULO DI NIACINA**Principio:**

Mycobacterium tuberculosis è l'unica specie che accumuli, regolarmente e in grande quantità, niacina nel terreno di coltura. Per il rilevamento della niacina è necessaria una coltura, su terreno a base di uovo, su cui si siano sviluppate, ben aerate, numerose colonie mature (una crescita di questo tipo richiede almeno tre settimane di incubazione).

Reagenti:

- Strisce reattive *Niacin test strips* (Becton Dickinson).

Procedimento:

- Praticare, con un'ansa rigida, delle incisioni nel terreno in modo da aumentare la superficie di contatto con il liquido di estrazione;
- aggiungere al tubo di Löwenstein-Jensen 2,5 mL di acqua distillata sterile;
- per estrarre la niacina incubare *overnight* a 37 °C la coltura, mantenendo il tubo in posizione inclinata in modo che l'acqua ricopra per intero lo *slant*;
- riportare il tubo in posizione verticale e recuperare con una pipetta Pasteur il liquido di estrazione;
- ripartire il liquido di estrazione fra due provette e aggiungere a una di esse la striscia reattiva; la seconda provetta serve da confronto ("bianco");
- leggere dopo 15 minuti: il viraggio al giallo del liquido della provetta contenente la striscia reattiva (l'interpretazione è facilitata dal confronto con il "bianco") è indice di positività. Se il

colore non differisce sostanzialmente da quello del “bianco” il test è da considerarsi negativo (fig. 8.2).

Per i particolari tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

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

8.1.3.2. RIDUZIONE DEI NITRATI

Principio:

Alcune specie micobatteriche, compreso *Mycobacterium tuberculosis*, sono capaci di ridurre i nitrati a nitriti.

Reagenti:

- *Nitrate broth*, sterile;
- miscela cristallina contenente: una parte di acido solfanilico, una parte di N-(L-naftil)-etilen-diamina dicloridrato e dieci parti di acido L-(+)-tartarico (stabile per un anno se conservata a temperatura ambiente, al buio).

Procedimento:

- Sospendere un'ansata di colonie micobatteriche in una provetta contenente 0,5 mL di acqua distillata sterile;
- aggiungere 2 mL di *Nitrate broth* e incubare per 4 ore a 37 °C;
- al termine dell'incubazione aggiungere una piccola spatolata della miscela cristallina e agitare.

Il test è positivo se si sviluppa, entro pochi secondi, una colorazione variabile da rosa a rosso, mentre è negativo se non si rileva alcun cambiamento di colore (fig. 8.3).

Controllo di qualità:

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

8.2. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE ANALISI DEI LIPIDI DELLA PARETE MICOBATTERICA

8.2.1. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Principio:

Nella parete dei micobatteri sono presenti acidi grassi a catena lunga denominati acidi micolici; questi, una volta estratti e derivatizzati, possono essere analizzati mediante HPLC.

Nella HPLC viene utilizzato un liquido (fase mobile) per veicolare il campione attraverso la fase stazionaria contenuta, allo stato solido, nella colonna; i componenti della miscela di acidi micolici emergono dalla colonna a tempi diversi in base alla loro maggiore o minore affinità per la fase stazionaria, e il tracciato che ne risulta è specie-specifico (2, 3, 18).

L'identificazione si ottiene confrontando il profilo cromatografico del ceppo in esame con tutta una serie di profili di riferimento (fig. 8.4). Al cromatografo per HPLC della ditta MIDI è abbinabile un software (Sherlock *Mycobacteria*, MIDI) che identifica in automatico le principali specie di micobatteri per confronto con i tracciati presenti nella *library* interna.

Una ricca libreria di profili HPLC è disponibile su internet all'indirizzo: <http://www.MycobacToscana.it>.

L'identificazione dei micobatteri mediante HPLC degli acidi micolici della parete ha goduto di molta popolarità nell'ultimo ventennio, ma i suoi limiti sono diventati evidenti a causa del moltiplicarsi di numerose specie, in particolare fra i micobatteri a crescita rapida, nei cui confronti il potere discriminante si è rivelato insufficiente.

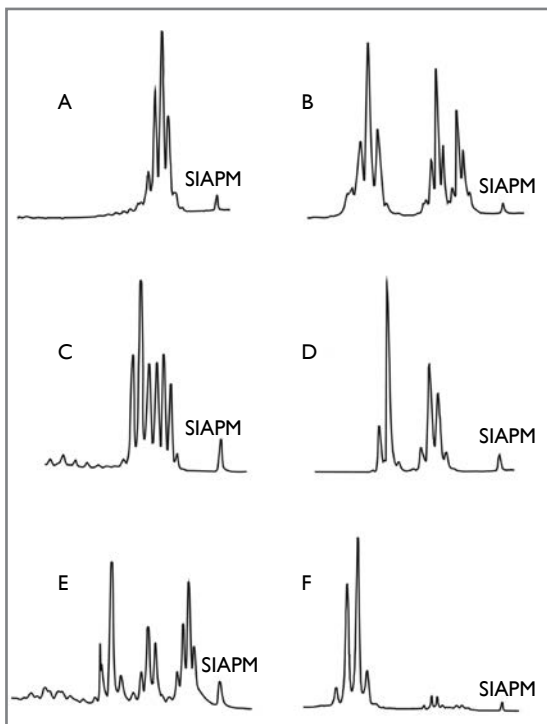


Fig. 8.4. PROFILI HPLC DEGLI ACIDI MICOLICI DELLA PARETE.

A, *M. TUBERCULOSIS*

B, *M. INTRACELLULARE*

C, *M. GORDONAE*

D, *M. CHELONAE*

E, *M. SIMIAE*

F, *M. NONCHROMOGENICUM*

SIAPM, STANDARD INTERNO AD ALTO PESO MOLECOLARE

8.2.2. GASCROMATOGRAFIA (*GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY, GLC*)

Principio:

Nella GLC viene utilizzato un gas (fase mobile) per veicolare il campione attraverso la fase stazionaria contenuta, allo stato liquido, nella colonna. Quando la miscela di lipidi estratti dalla parete di un ceppo micobatterico raggiunge la colonna, l'elevata temperatura a cui questa opera (attorno ai 300 °C) fa sì che gli acidi micolici producano, per pirolisi, esteri metilici saturi, le cui catene possono essere composte da 22, 24 o 26 atomi di carbonio. Oltre a tali prodotti di clivaggio vengono eluiti dalla colonna anche acidi grassi saturi e insaturi (fra i quali l'acido tuberculostearico) nonché alcol. Il riconoscimento dei differenti prodotti di eluizione si ottiene normalmente mediante spettrometria di massa. I prodotti di clivaggio, che sono specifici per i diversi tipi di acidi micolici, producono, assieme agli acidi grassi e agli alcol, pattern specie-specifici (fig. 8.5) che possono essere impiegati a scopo identificativo (7).

I limiti principali dell'utilizzo della GLC per l'identificazione dei micobatteri risiedono nella scarsa riproducibilità inter-laboratorio e nell'insufficiente potere discriminante. Quest'ultimo problema è peraltro destinato ad acuirsi a causa della crescente frequenza con cui vengono descritte specie nuove.

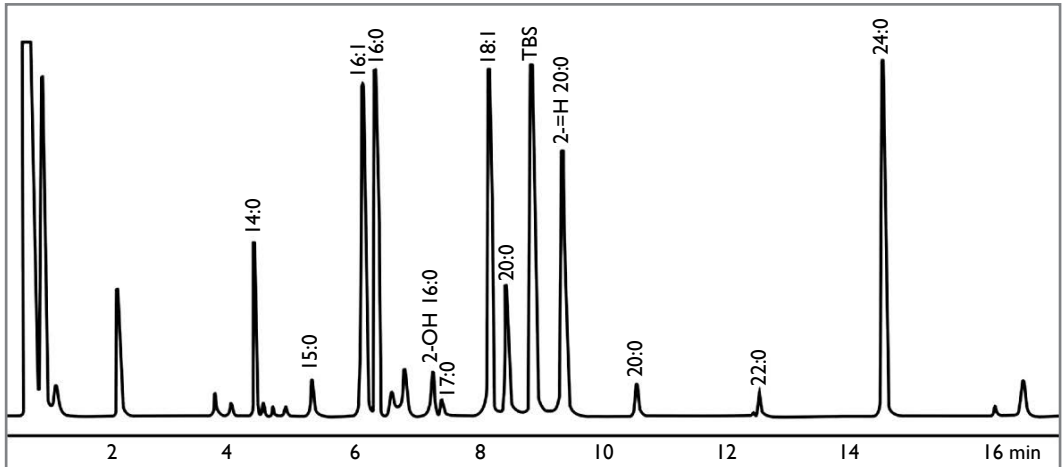


Fig. 8.5. PROFILO GAS-CROMATOGRAFICO RELATIVO AI PRODOTTI DI CLIVAGGIO DEGLI ACIDI MICOLICI, AGLI ACIDI GRASSI SATURI E INSATURI E AGLI ALCOL PRESENTI NELLA PARETE DI *M. AVIUM*. I NUMERI PRESENTI SU ALCUNI PICCHI INDICANO IL NUMERO DI ATOMI DI CARBONIO.

8.2.3. CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE (*THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC*)

Principio:

La TLC utilizza come fase stazionaria una piastra di gel di silice sulla cui superficie viene depositato l'estratto, contenente gli acidi micolici, ottenuto dal micobatterio in esame. Un solvente (fase mobile), che avanza per capillarità sulla piastra, separa i differenti acidi micolici presenti in base alla loro diversa affinità per il solvente medesimo. A migrazione completata, dopo che la piastra è stata colorata, i singoli acidi micolici si presentano sotto forma di macchie (fig. 8.6). L'identificazione degli acidi micolici si ricava dalla posizione delle macchie rispetto al punto di deposizione. A tale scopo, su ogni piastra, accanto ai campioni in esame, vengono fatti correre dei ceppi di riferimento (di cui è noto il pattern di acidi micolici) ed è per confronto con la posizione delle macchie prodotte da questi ultimi che è possibile l'identificazione degli acidi micolici dei ceppi in esame e, di conseguenza, delle specie a cui questi appartengono (11).

La stragrande maggioranza delle specie di micobatteri presenta nella parete due o tre diversi tipi di acidi micolici. È evidente che, differenziandosi gli acidi micolici presenti nella parete dei micobatteri in sette tipi soltanto, il numero delle possibili combinazioni non può essere abbastanza elevato da consentire un'identificazione univoca di tutte le specie. La maggioranza dei pattern sono pertanto condivisi da raggruppamenti di più specie.

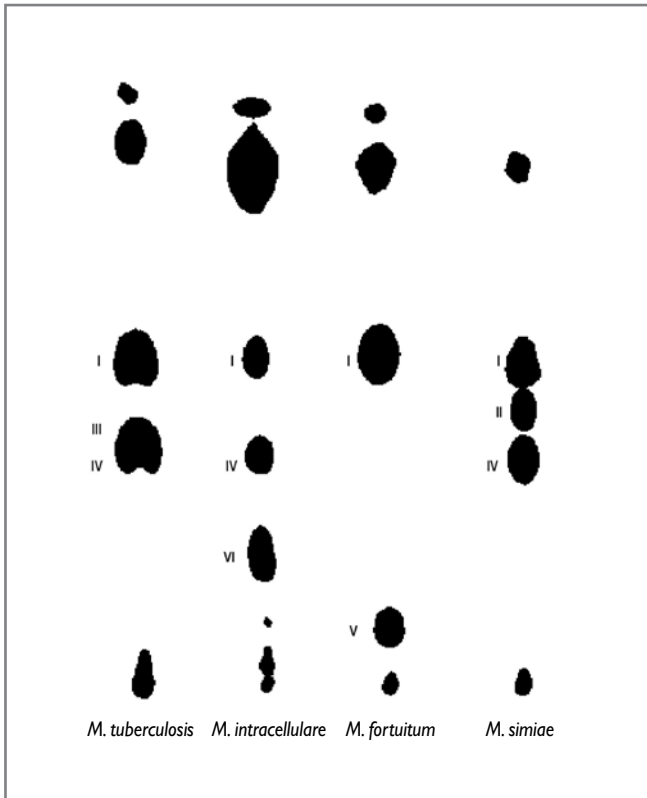


Fig. 8.6. CROMATOGRAFIA SU STRATO SOTTILE DEGLI ACIDI MICOLICI DELLA PARETE DELLE SPECIE *M. TUBERCULOSIS*, *M. INTRACELLULARE*, *M. FORTUITUM* E *M. SIMIAE*.

I, α -MICOLATI
II α' -MICOLATI
III, METOXI-MICOLATI
IV, CHETO-MICOLATI
V, EPOXI-MICOLATI
VI, CERE.

8.3. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION TIME OF FLIGHT (MALDI-ToF)

Principio:

Nella tecnica MALDI un campione assorbito su una matrice viene ionizzato e vaporizzato mediante bombardamento con un fascio laser. Il campo magnetico presente nello spettrometro di massa separa, in funzione del rapporto massa/carica, gli ioni presenti nella miscela vaporizzata e misura il tempo (ToF, *Time of Flight*) da questi impiegato per raggiungere il *detector*. Il diagramma derivante da tali misurazioni costituisce lo spettro di massa.

Nell'applicazione destinata all'identificazione dei microrganismi, una piccola quantità di ciascuna colonia in esame viene deposta su uno degli *spot* presenti sulla superficie della piastra metallica bersaglio del raggio laser. L'analisi procede automaticamente e l'identificazione scaturisce dal confronto del numero e dell'intensità dei picchi presenti nello spettro di massa ottenuto con i dati della *library* dello strumento.

L'utilizzo del sistema MALDI-ToF per l'identificazione dei micobatteri è ancora oggi in fase sperimentale; la difficoltà di mettere a punto un database di riferimento è in gran parte dovuta alla necessità di ottenere dai micobatteri un estratto proteico abbastanza "pulito" da produrre spettri di massa

chiari e ripetibili. Nei pochi articoli pubblicati sono state testate varie metodiche di preparazione del campione; si è passati dalla semplice inattivazione con etanolo al 70% (9) a estrazioni che includono, dopo l'inattivazione a 95 °C, una serie di "lavaggi" con acqua distillata, etanolo, acido formico e acetone, preceduti (4) o meno (15), dalla dissociazione degli aggregati cellulari con Tween 20. Il database interno allo strumento (Bruker Daltonics) include un numero limitato di specie micobatteriche, tanto che tutti gli Autori hanno sentito la necessità di integrarlo con propri ceppi di riferimento; nondimeno il numero delle specie incluse rimane ben al di sotto del 50% di quelle note. La mancanza di un protocollo di estrazione standardizzato e le attuali carenze del database fanno ritenere che i tempi dell'identificazione dei micobatteri col sistema MALDI-ToF non siano ancora maturi.

8.4. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE DNA-PROBE

Si impiegano a scopo identificativo sonde costituite da DNA a catena singola aventi sequenza specie-specifica. Qualora la sonda riconosca, nel genoma del microrganismo in esame, una sequenza complementare, si verifica ibridizzazione, e l'identificazione viene desunta dalla specificità della sonda medesima.

In commercio esistono quattro sistemi di identificazione basati sull'uso di sonde molecolari (8, 12, 14, 19): AccuProbe (Gen-Probe, bioMérieux), GenoType *Mycobacterium* (Hein), GenoType MTBC (Hein) e INNO LiPA *Mycobacteria* (Innogenetics), tutti utilizzabili a partire da organismi cresciuti sia in terreno solido che liquido.

8.4.1. IBRIDIZZAZIONE IN FASE LIQUIDA CON SONDE ACCUPROBE

Principio:

In condizioni di elevata stringenza, l'RNA presente nell'estratto del ceppo in esame viene posto in contatto con una sonda di DNA a catena singola. Tale sonda, che è marcata con esteri di acridinio, è complementare a un tratto specie-specifico dell'rRNA 16S. In assenza di ibridizzazione, l'aggiunta di un apposito reagente d'idrolisi inattiva l'estere di acridinio legato alla sonda, mentre, in presenza di ibridizzazione, il marcatore risulta protetto dalla struttura della molecola ibrida e non viene inattivato. L'eccitazione dell'estere di acridinio mediante un apposito reagente determina emissione di luce che testimonia l'avvenuta ibridizzazione. L'identificazione è data dalla specificità della sonda in presenza della quale si è avuta emissione luminosa.

Reagenti:

Kit AccuProbe disponibili per:

- *Mycobacterium tuberculosis* complex;
- *Mycobacterium avium* complex;
- *M. avium*;
- *M. intracellulare*;
- *M. kansasii*;
- *M. goodii*.

Procedimento:

L'identificazione mediante AccuProbe prevede il cimento, in successione, del ceppo in esame con i vari *probe* disponibili, fino al conseguimento di una reazione positiva; generalmente l'osser-

vazione delle caratteristiche delle colonie permette di limitare il saggio soltanto alla sonda, o alle sonde, specifiche per le specie con caratteristiche fenotipiche compatibili.

Per i particolari tecnici si rimanda alle indicazioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Qualche interferenza dovuta al sangue si può avere con i ceppi isolati da emocolture; al problema è però possibile ovviare mettendo in contatto in una provetta 1 mL di emocoltura e 100 µL di una soluzione 0,05 M di EDTA contenente 10% di sodio dodecil-solfato a pH 7.2; il test viene eseguito, con le modalità usate per le colture in terreno liquido, su 100 µL di sedimento ottenuto per centrifugazione dopo un lavaggio con acqua distillata.

Per alcune delle sonde suddette sono state segnalate reazioni crociate (20), illustrate nella tabella 2.

Tab. 2 - REAZIONI CROCIATE DI ALCUNE SONDE DEL SISTEMA ACCUProbe.

Sonda	Reazioni attese	Reazioni crociate
AccuProbe <i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. arosiense</i> <i>M. chimaera</i> <i>M. nebraskense</i> <i>M. saskatchewanense</i>
AccuProbe <i>M. avium</i> complex	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> micobatteri appartenenti al MAC diversi da <i>M. avium</i> e <i>M. intracellulare</i>	<i>M. arosiense</i> <i>M. chimaera</i> <i>M. colombiense</i> <i>M. nebraskense</i> <i>M. palustre</i> <i>M. paraffinicum</i> <i>M. saskatchewanense</i> <i>M. vulneris</i>
AccuProbe <i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. holsaticum</i>

Controllo di qualità:

Ad ogni cambio di lotto sottoporre al test ceppi di due specie, uno che funge da controllo positivo, appartenente alla specie per cui il *probe* è specifico, e l'altro appartenente a una specie diversa, che funge da controllo negativo.

8.4.2. IBRIDIZZAZIONE INVERSA, IN FASE SOLIDA, CON GENOTYPE MYCOBACTERIUM

Principio:

Dopo aver estratto il DNA, si amplifica mediante PCR (utilizzando *primer* biotinilati) una parte del gene codificante per l'rRNA 23S. Alcune sonde, aventi diversa specificità, sono immobilizzate, in linee parallele, su una striscia di nitrocellulosa (fig. 8.7). Incubando la striscia assieme al prodotto dell'amplificazione si ha ibridizzazione ogniqualvolta quest'ultimo contiene ampliconi complementari a una o più sonde. L'aggiunta di un coniugato avidina-enzima e di un substrato cromogeno

determina la comparsa, sulla striscia, di una banda colorata in corrispondenza di ciascuna sonda che ha dato luogo a ibridizzazione. L'identificazione si ricava confrontando con l'apposito schema interpretativo il pattern di bande ottenuto (fig. 8.8).

Reagenti:

Il kit GenoType *Mycobacterium* è disponibile nelle versioni:

- CM, che permette l'identificazione di: *M. avium*, *M. chelonae*/*M. immunogenum*, *M. abscessus*/*M. immunogenum*, *M. fortuitum* 1, *M. fortuitum* 2/*M. mageritense*, *M. goodii*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*/*M. paraffinicum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*/*M. haemophilum*/*M. palustre*/*M. nebraskense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. tuberculosis* complex, *M. peregrinum*/*M. alvei*/*M. septicum*, *M. xenopi*. CM include inoltre due sonde che riconoscono rispettivamente tutti i microrganismi Gram-positivi ad alto contenuto di guanina-citosina e tutti i membri del genere *Mycobacterium*;
- AS, che permette l'identificazione di: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*/*M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*/*M. nebraskense*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*. AS include inoltre due sonde che riconoscono rispettivamente tutti i microrganismi Gram-positivi ad alto contenuto di guanina-citosina e tutti i membri del genere *Mycobacterium*.

Procedimento:

Per i particolari tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Per l'identificazione mediante GenoType *Mycobacterium* è consigliato l'impiego, in prima battuta, del kit CM e, solo nel caso di risultato negativo, il ricorso al kit AS.

Per alcune delle sonde suddette sono state segnalate reazioni crociate (20), illustrate nella tabella 3.

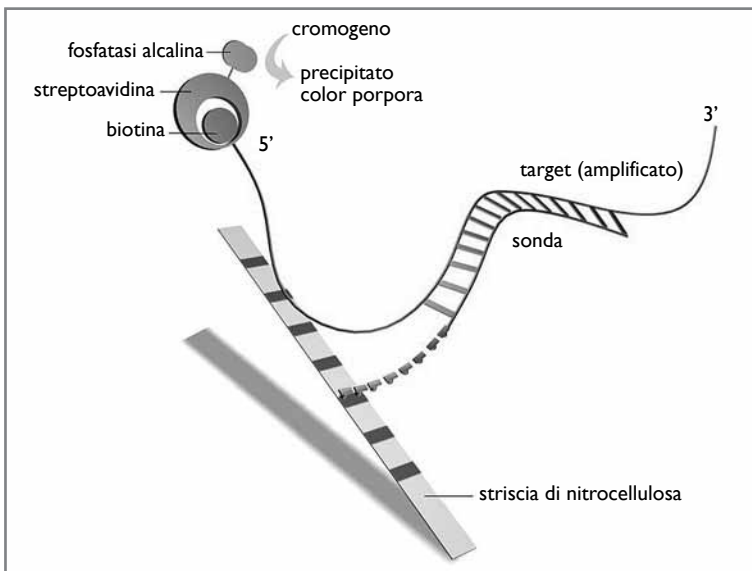


Fig. 8.7.
RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA IBRIDIZZAZIONE INVERSA MEDIANTE LINE PROBE ASSAY (LiPA).

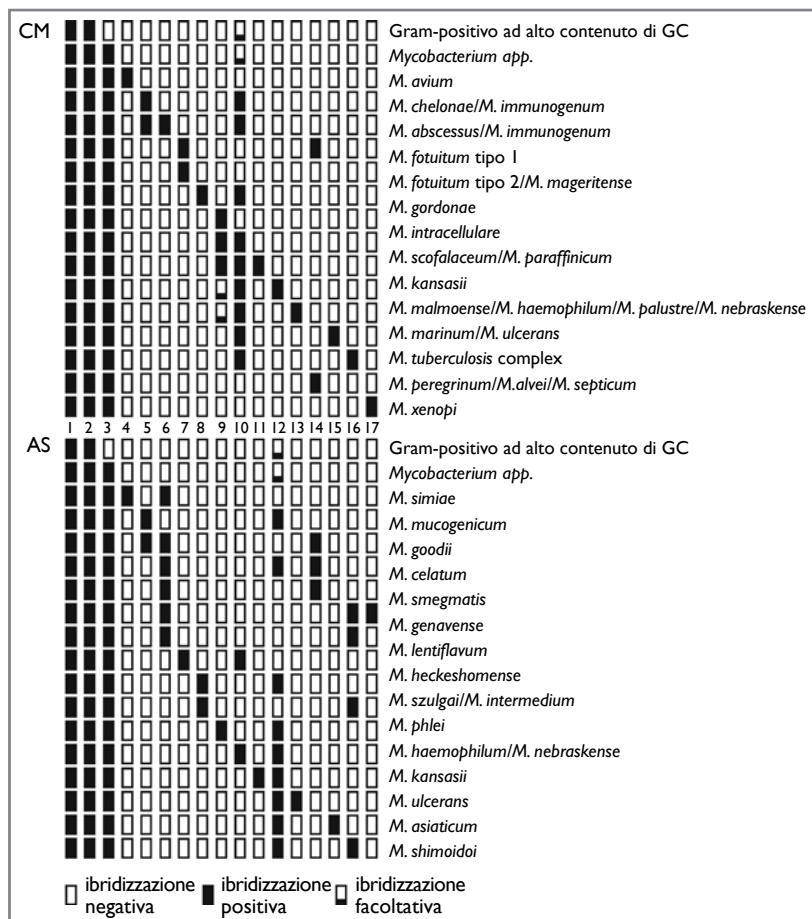


Fig. 8.8. SCHEMA INTERPRETATIVO DI GENOTYPE MYCOBACTERIUM CM E AS.

Tab. 3 - REAZIONI CROCIATE DI ALCUNE SONDE DEL SISTEMA GENOTYPE MYCOBACTERIUM.

CM	2-3-7-14	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. boenickei</i> , <i>M. farcinogenes</i> , <i>M. houstonense</i> , <i>M. neworleansense</i> , <i>M. parafortuitum</i> , <i>M. porcinum</i> , <i>M. senegalense</i> , <i>M. setense</i>
CM	2-3-7	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. mageritense</i>	<i>M. conceptionense</i> , <i>M. wolinskyi</i>
CM	2-3-9	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. arosiense</i> , <i>M. chimaera</i> , <i>M. colombiense</i> , <i>M. mantanii</i> , <i>M. saskatchewanense</i> , MAC ^a
CM	2-3-9-10	<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. parascrofulaceum</i> <i>M. paraffinicum</i>	<i>M. alsienne</i>
CM	2-3-(9)-10-12	<i>M. kansasii</i>	<i>M. gastris</i>
CM	2-3-10-16	<i>M. tuberculosis complex</i>	<i>M. riadhense</i>
AS	2-3-4-6	<i>M. simiae</i>	<i>M. sherrisi</i>
AS	2-3-5-12	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. aubagnense</i> , <i>M. llatzerense</i> , <i>M. phocaicum</i>

^a Ceppi inclusi nel MAC ma non appartenenti ad alcuna delle specie descritte.

Controllo di qualità:

Ad ogni cambio di lotto sottoporre al test due ceppi appartenenti a due specie diverse di cui una, che funge da controllo positivo, compresa fra quelle identificabili con la striscia in uso, e un'altra, non compresa, che funge da controllo negativo.

8.4.3. IBRIDIZZAZIONE INVERSA, IN FASE SOLIDA, CON GENOTYPE MTBC**Principio:**

Dopo aver estratto il DNA si amplificano, mediante *multiplex* PCR (utilizzando una miscela di primer biotinilati):

- una parte del gene codificante per l'rRNA 23S;
- frammenti di quattro diverse regioni del gene *gyrB*;
- le sequenze adiacenti alla regione RD-I.

Su una striscia di nitrocellulosa sono presenti, immobilizzate in linee parallele, una sonda specifica per l'rRNA 23S delle specie appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex, quattro sonde specifiche per altrettante mutazioni specie-specifiche del gene *gyrB* e una sonda specifica per i tratti che fiancheggiano, alle due estremità, la regione RD-I:

- la sonda rRNA 23S permette di confermare l'appartenenza del ceppo in esame al *Mycobacterium tuberculosis* complex;
- le sonde *gyrB* permettono di differenziare *M. tuberculosis*/*M. africanum* II/"*M. canettii*" da *M. africanum* I, da *M. bovis*/*M. bovis* BCG, da *M. microti* e da *M. caprae*;
- l'ibridazione della sonda specifica per le regioni adiacenti a RD-I, possibile soltanto per i ceppi privi di RD-I (la presenza di RD-I non permette la produzione degli ampliconi corrispondenti alle due sequenze che lo delimitano) identifica *Mycobacterium bovis* BCG differenziandolo da *Mycobacterium bovis*.

Incubando la striscia assieme al prodotto di amplificazione si ottiene un pattern di ibridizzazione che diviene visibile dopo l'aggiunta di coniugato avidina-enzima e di substrato cromogeno. L'identificazione si ricava confrontando con l'apposito schema interpretativo il pattern di bande ottenuto (fig. 8.9).

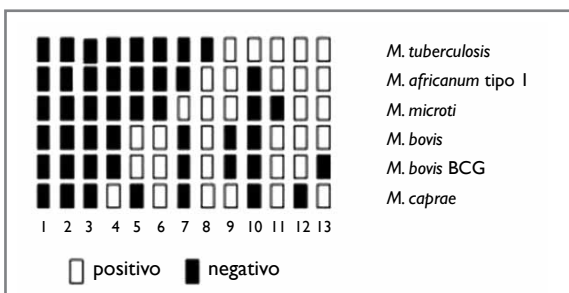


Fig. 8.9. SCHEMA INTERPRETATIVO DEL SISTEMA GENOTYPE MTBC. IL PATTERN DI *M. TUBERCULOSIS* È CONDIVISO ANCHE DA *M. AFRICANUM* TIPO II E "*M. CANETTII*".

Reagenti:

- Kit GenoType MTBC.

Procedimento:

Per i particolari tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

Ad ogni cambio di lotto sottoporre al test due ceppi, uno dei quali, che funge da controllo positivo, appartenente al *Mycobacterium tuberculosis* complex, e un altro, di specie diversa, che funge da controllo negativo.

8.4.4. IBRIDIZZAZIONE INVERSA, IN FASE SOLIDA, CON INNO LiPA MYCOBACTERIA**Principio:**

Dopo aver estratto il DNA, si amplifica mediante PCR (utilizzando primer biotinilati) una parte del gene codificante per lo spaziatore (*Internal Transcribed Spacer, ITS*) interposto fra i geni codificanti per rRNA 16S e rRNA 23S. Alcune sonde, con diversa specificità di specie, sono immobilizzate, in linee parallele, su una striscia di nitrocellulosa. Incubando la striscia assieme al prodotto dell'amplificazione si ha ibridizzazione ogniqualvolta quest'ultimo contenga ampliconi complementari a una o più sonde. L'aggiunta di coniugato avidina-enzima e di un substrato cromogeno determina la comparsa, sulla striscia, di una banda colorata in corrispondenza di ciascuna sonda che ha dato luogo ad ibridizzazione. La posizione, sulla striscia, della banda che ha dato luogo a ibridizzazione ne individua la specificità e permette l'identificazione del ceppo in esame (fig. 8.10).

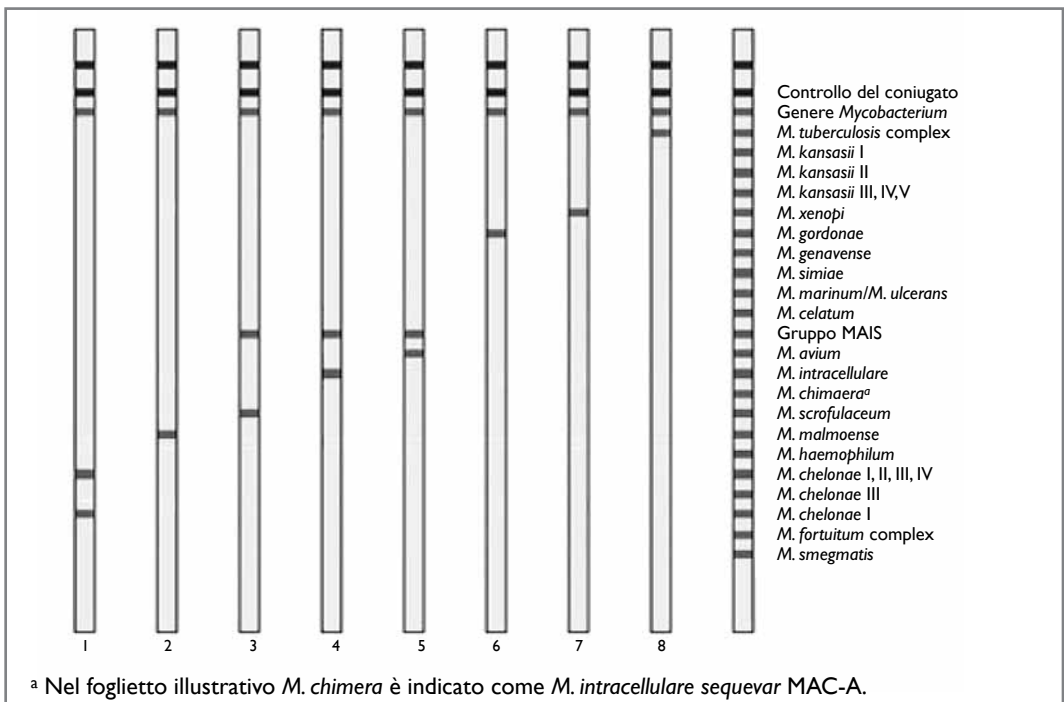


Fig. 8.10. INTERPRETAZIONE DELLE STRISCE INNO LiPA MYCOBACTERIA.

Reagenti:

- Kit INNO LiPA *Mycobacteria* che permette l'identificazione di: *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. kansasii* genotipo I, *M. kansasii* genotipo II, *M. kansasii* genotipi III/IV/V/*M. gastri*, *M.*

xenopi, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. celatum*, *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera* (nel foglietto illustrativo *M. chimera* è indicato come *M. intracellulare sequevar* MAC-A.), *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. chelonae* complex genotipi I/II/III/IV, *M. chelonae* complex genotipo I, *M. chelonae* complex genotipo III, *M. fortuitum* complex e *M. smegmatis*. È presente inoltre una sonda che riconosce tutti i membri del genere *Mycobacterium*.

Per alcune delle sonde suddette sono state segnalate reazioni crociate (20), illustrate nella tabella 4.

Tab. 4 - REAZIONI CROCIATE DI ALCUNE SONDE DEL SISTEMA INNO LiPA MYCOBACTERIA.

Sonde	Reazioni attese	Reazioni crociate
MSI	<i>M. simiae</i>	<i>M. sherrisii</i>
MMU	<i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i>	<i>M. pseudoshottsii</i> , <i>M. shottsii</i>
MAIS	<i>M. avium</i> complex, <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. hemophilum</i>	<i>M. heidelbergense</i> , <i>M. mantenii</i> , <i>M. nebraskense</i> , <i>M. paraffinicum</i> , <i>M. parascrofulaceum</i>
MIN2	<i>M. chimaera</i> ^a	<i>M. nebraskense</i> , <i>M. paraffinicum</i>
MFO	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. smegmatis</i>	<i>M. alvei</i> , <i>M. conceptionense</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M. mageritense</i> , <i>M. neworleansense</i> , <i>M. senegalense</i> , <i>M. septicum</i> , <i>M. thermoresistibile</i> , <i>M. wolinskyi</i>

^a Nel foglietto illustrativo *M. chimaera* è indicato come *M. intracellulare sequevar* MAC-A.

Procedimento:

Per i particolari tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

Ad ogni cambio di lotto sottoporre al test due ceppi appartenenti a due specie diverse di cui solo una, che funge da controllo positivo, è compresa fra quelle identificabili col sistema INNO LiPA, mentre l'altra funge da controllo negativo.

8.5. DIFFERENZIAZIONE DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX MEDIANTE TEST IMMUNO-CROMATOGRAFICI

Principio:

Le specie appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex producono, e secernono, durante la coltura, la proteina MPT64 che non viene secreta dalle altre specie del genere *Mycobacterium*. Il sistema immuno-cromatografico utilizza anticorpi di topo specifici per la proteina MPT64 coniugati a particelle di oro colloidale. Tale coniugato è presente, all'interno di una membrana porosa, in vicinanza del sito destinato alla deposizione del campione. Quando una goccia di coltura liquida positiva per micobatteri viene depositata sul supporto, il liquido diffonde nella membrana e la proteina MPT64, se presente, si lega al coniugato. In una posizione predefinita della membrana sono immobilizzati altri anticorpi specifici per MTP64, che legando la proteina formano un sandwich coniugato-MTP64-anticorpo immobilizzato evidenziato come una banda. Una seconda banda di controllo si forma in una regione del supporto in cui sono immobilizzati anticorpi secondari antitopo. Il coniugato in eccesso, non legato alla

proteina MPT64, diffonde ulteriormente nel supporto richiamato da un cuscinetto assorbente.

Reagenti:

- Tavoletta BD MGIT TBc Identification Test (Becton Dickinson) (fig. 8.11).

Procedimento:

- Depositare 100 µL di coltura MGIT positiva per bacilli acido-resistenti nell'apposito pozzetto della tavoletta;
- attendere 15 minuti per la diffusione;
- interpretare il risultato: la presenza della sola banda di controllo indica assenza di micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex; la presenza di entrambe le bande indica presenza di micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Per i dettagli tecnici si rimanda al foglietto illustrativo disponibile nella versione su CD.

Controllo di qualità:

Testare un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* e uno di *Mycobacterium gordonae* per ogni nuovo lotto del kit.

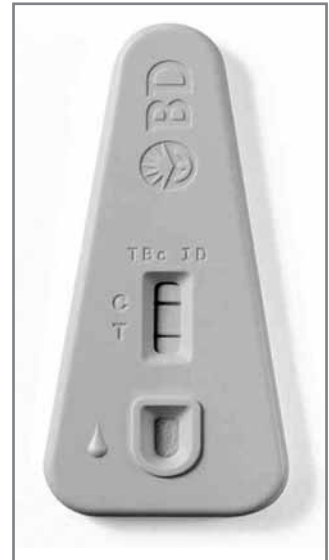


Fig. 8.11. BD MGIT TBc IDENTIFICATION TEST.

8.6. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE PCR RESTRICTION ANALYSIS (PRA)

Principio:

Dopo aver estratto il DNA si amplifica mediante PCR un frammento di circa 440 pb del gene *hsp65*, codificante per la *heat shock* protein da 65 kD; successivamente due aliquote del prodotto di amplificazione vengono sottoposte separatamente all'azione di due enzimi di restrizione: *BstEII* e *HaeIII* (16). Il prodotto di restrizione di ciascun enzima varia, nelle singole specie, per il numero e/o per le dimensioni dei frammenti prodotti (solitamente i frammenti inferiori a 40 pb non vengono considerati). Una corsa elettroforetica consente di determinare il numero e, per confronto con una scala di pesi molecolari, le dimensioni dei frammenti (fig. 8.12). È possibile risalire dal pattern di restrizione all'identificazione del micobatterio ricorrendo a un apposito algoritmo.

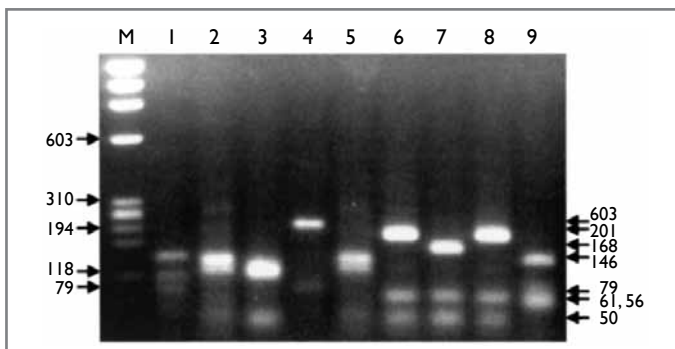


Fig. 8.12. PRA-PATTERN OTTENUTI CON L'ENZIMA DI RESTRIZIONE *HaeIII*, DALLE SPECIE: 1, *M. TUBERCULOSIS*; 2, *M. AVIUM*; 3, *M. INTRACELLULARE*; 4, *M. KANSASII*; 5, *M. SZULGAI*; 6, *M. FORTUITUM*; 7, *M. ABSCESSUS*; 8, *M. CHELONAE*; 9, *M. CHITAE*. M, SCALA DEI PESI MOLECOLARI.

Reagenti:

- Nucleotidi;
- Taq polimerasi;
- *Primer*:
TBI1 [5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT];
TBI2 [5'-CTTGTCTGAACCGCATACCCT];
- enzimi di restrizione: *BstEII* e *HaeIII*;
- standard dei pesi molecolari;
- gel di poliacrilamide al 10% (PAGE).

Procedimento:

- Estrazione del DNA: bollire per 10 minuti una piccola quantità di una colonia cresciuta su terreno solido o del sedimento ottenuto centrifugando una coltura liquida;
- digestione enzimatica: incubare per 60 minuti due aliquote (5 µL) di amplificato, ciascuna con 2 µL di un diverso enzima di restrizione (1 U/µL), con 2 µL di tampone di restrizione con 15 µL di acqua distillata sterile. Le temperature di incubazione da impiegare sono rispettivamente 60 °C per *BstEII* e 37 °C per *HaeIII*;
- elettroforesi: far correre i frammenti di restrizione su PAGE assieme allo standard di pesi molecolari. Stimare il peso molecolare dei frammenti, preferibilmente usando un sistema computerizzato;
- identificazione: interpretare i risultati utilizzando il database PRAsite disponibile su internet all'indirizzo: <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>.

Controllo di qualità:

In ogni seduta far correre, in parallelo con i prodotti di restrizione dei ceppi da identificare, anche quello di un micobatterio il cui pattern PRA sia noto.

8.7. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENICO

Principio:

Si utilizza il DNA estratto da una colonia o da una coltura liquida. Un frammento noto per contenere sequenze specie-specifiche viene amplificato mediante PCR. Sul prodotto di amplificazione viene quindi eseguita una seconda amplificazione che differisce dalla precedente per la presenza, assieme ai normali nucleotidi, di una aliquota di nucleotidi *terminator*. I nucleotidi *terminator* si differenziano dai normali nucleotidi per l'incapacità di stabilire un legame in posizione 3', bloccando quindi, una volta incorporati, l'allungamento della catena di acido nucleico. Quattro fluorocromi diversi, a seconda del tipo di base azotata presente, marcano i nucleotidi *terminator*. Dato che il legame dei nucleotidi *terminator* è casuale, si formano filamenti di tutte le lunghezze possibili: dalla più corta, nel caso in cui il *terminator* si leghi direttamente al *primer*, alla più lunga, in cui esso costituisce l'ultimo elemento della sequenza. I frammenti così prodotti vengono ordinati elettroforeticamente, in base alla loro lunghezza, e la successione dei segnali fluorescenti riproduce la sequenza delle basi azotate. Attualmente le fasi di elettroforesi e di rilevazione della fluorescenza vengono eseguite in automatico da appositi apparecchi (tab. 5).

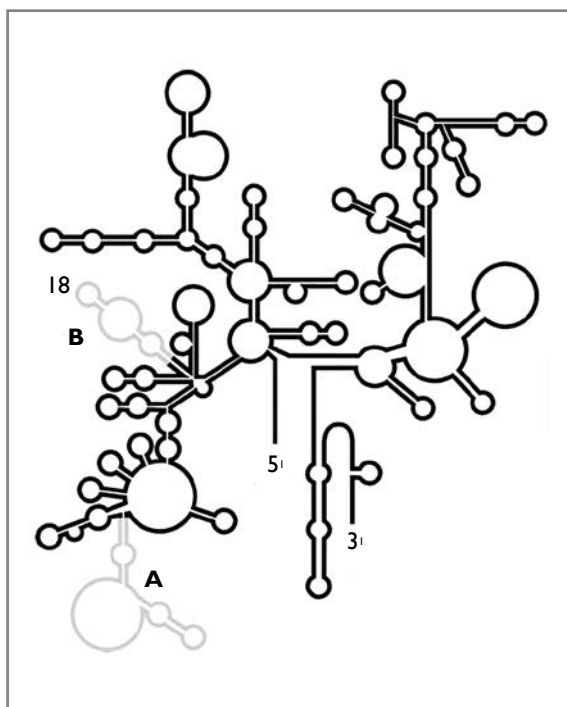
Tab. 5 - RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA PROCEDURA DI SEQUENZIAMENTO CON SEQUenziATORE CAPILLARE.

Amplificazione mediante PCR del DNA bersaglio (es. 100 pb)
Amplificazione del precedente amplificato in presenza di nucleotidi <i>terminator</i> (marcati, a seconda della base, da quattro diversi fluorocromi) e del solo <i>primer forward</i> . In una seconda provetta analoga viene usato il solo <i>primer reverse</i> ; i relativi amplificati andranno poi incontro, separatamente, alla procedura riportata sotto
Produzione di spezzoni di sequenza di lunghezza variabile (dalla più corta = <i>primer</i> + 1 base, alla più lunga = <i>primer</i> + 100 basi); in tutti l'ultima base è marcata (<i>terminator</i>)
Ordinamento degli spezzoni mediante elettroforesi, all'interno di un capillare al termine del quale, attraverso un'apposita finestra, vengono colpiti da un raggio laser
Emissione, da parte di ciascuno spezzone colpito dal raggio laser, di un segnale luminoso la cui lunghezza d'onda varia a seconda del fluorocromo che marca il nucleotide terminale
Lettura dei segnali luminosi da parte di un diodo e conversione dei medesimi in un tracciato (elettroferogramma) in cui l'ordine e il colore dei picchi corrispondono alla sequenza e al tipo delle basi

La regione genica più comunemente sequenziata a fini identificativi è il gene codificante per l'rRNA 16S (fig. 8.13); altre regioni idonee si trovano nel gene *hsp65*, che codifica per le proteine da shock termico nella regione spaziatrice (ITS) interposta fra i geni codificanti per rRNA 16S e 23S, e nel gene *rpoB* codificante per la subunità β della RNA polimerasi (1, 6, 10, 13).

Il sequenziamento viene solitamente eseguito con procedure *home-made*. Per il gene rDNA 16S esistono in commercio kit "tutto incluso" che, per chi si cimenta per la prima volta con tale metodica, rappresentano quasi una tappa obbligatoria.

Fig. 8.13 - STRUTTURA SECONDARIA DELL'rRNA 16S CON LE REGIONI IPERVARIABILI A E B E, ALL'INTERNO DI QUEST'ULTIMA, L'ELICA 18.



Reagenti:

- PrepMan Ultra (Applied Biosystems);
- Kit MicroSeq (Applied Biosystems).

Procedimento:

Per i particolari tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Analisi dell'elettroferogramma:

L'elettroferogramma costituisce l'*output* del sequenziatore automatico. Esso consiste in una successione di picchi corrispondenti ai segnali emessi dai nucleotidi *terminator* man mano che i vari spezzoni di sequenza, disposti in ordine crescente di lunghezza, passano davanti alla finestrella di scansione. L'elettroferogramma, in cui i picchi corrispondenti alle quattro basi azotate sono rappresentati con colori diversi, corrisponde alla sequenza del segmento in esame (fig. 8.14). La qualità dell'elettroferogramma deve essere rigorosamente controllata; in particolare occorre verificare che non vi sia sovrapposizione di picchi e che la decodifica operata dallo strumento sia corretta.

In molti casi l'osservazione visiva permette di risolvere le ambiguità che il sistema non è in grado di interpretare.

Eccellenti programmi per la gestione e l'archiviazione delle sequenze sono MEGA e BioEdit, entrambi scaricabili gratuitamente da internet (<http://www.megasoftware.net/>; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Interrogazione del database:

L'identificazione del microrganismo in esame si raggiunge confrontando la sequenza ottenuta con le sequenze presenti in un database. In aggiunta ai database commerciali ve ne sono alcuni consultabili gratuitamente tramite internet; fra questi l'americano GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), l'europeo EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) e il giapponese DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) sono perfettamente sovrapponibili dato che, fra di essi, esiste un accordo di condivisione delle sequenze depositate. RIDOM (<http://www.ridom-rdna.de/>), il cui database comprende, per i micobatteri, solamente sequenze relative alle prime 500 pb dell'rDNA 16S e all'ITS, è nato con l'ambizioso proposito di fornire un servizio dall'elevato valore qualitativo: a differenza degli altri database (21) include infatti soltanto sequenze rigorosamente controllate. Tale lodevole iniziativa è però pesantemente penalizzata dalla mancanza di aggiornamenti negli ultimi anni.

Una volta inserita una sequenza nell'apposita finestra (BLAST), il database restituisce un elenco di microrganismi in ordine decrescente di somiglianza con il ceppo in esame e ne riporta la sequenza, appaiata con quella in esame con, evidenziate, le eventuali discordanze. La tecnologia del sequenziamento è notevolmente migliorata negli ultimi anni e consente oggi di ottenere elettroferogrammi di buona qualità anche in contesti non specialistici. L'interpretazione degli elettroferogrammi manca ancora però di regole precise e il raggiungimento di un'identificazione non corretta da una sequenza eccellente è molto frequente, in particolare per i micobatteri, organismi che sono strettamente legati tra loro a livello genetico.

Non necessariamente l'identificazione corrisponde alla specie con il più elevato grado di somiglianza; l'esperienza del microbiologo nella risoluzione delle discordanze e nella valutazione del loro "peso" gioca un ruolo determinante. Una *flow chart* utilizzabile per la scelta dell'identificazione più appropriata è riportata nella figura 8.15 (17). In rapida sintesi:

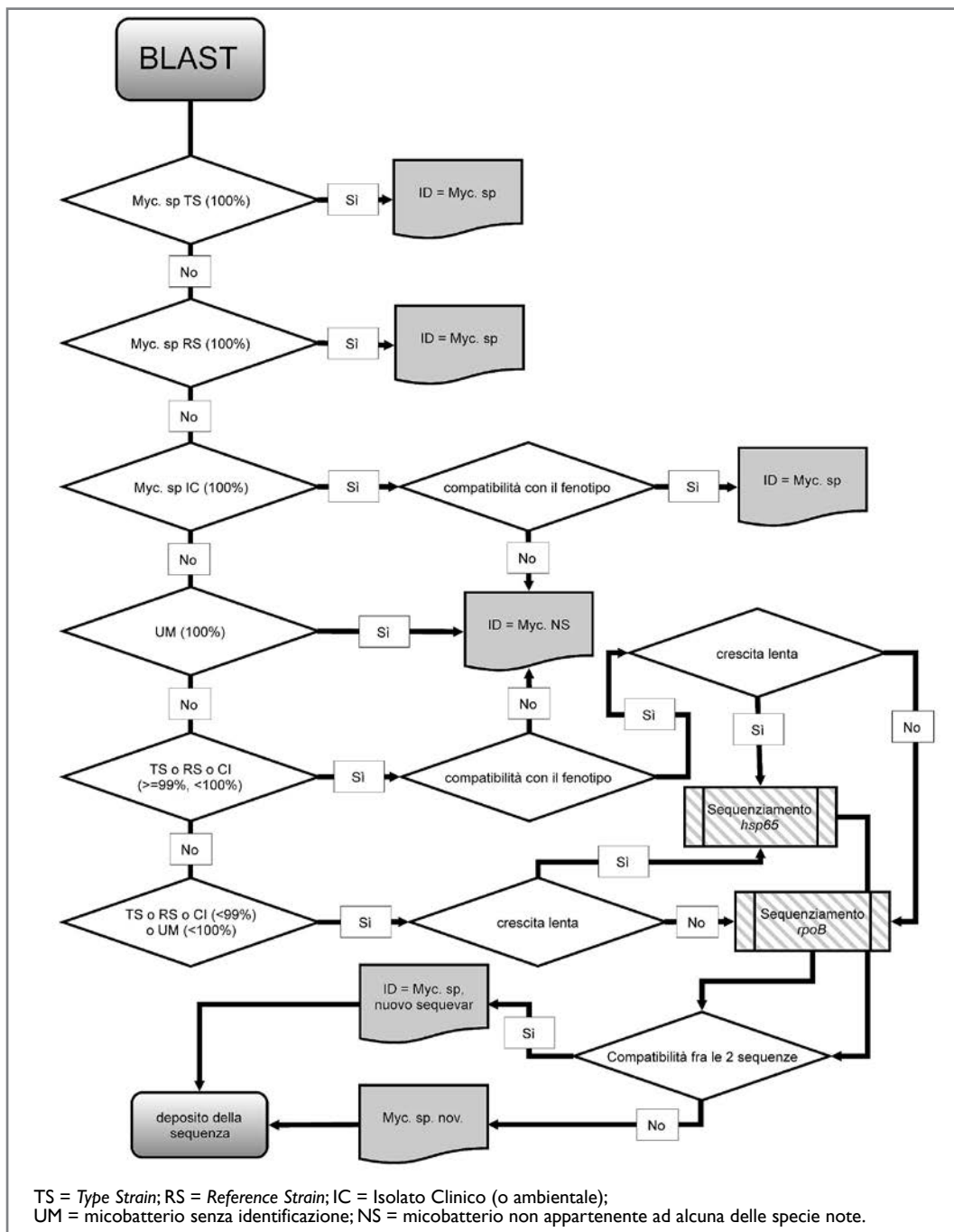


Fig. 8.15 - FLOW CHART PER LA SCELTA DELL'IDENTIFICAZIONE PIÙ APPROPRIATA FRA QUELLE SUGGERITE DA BLAST.

- l'identificazione del ceppo in esame è certa nel caso in cui la sua sequenza sia al 100% identica a quella del *type strain* di una, e una sola, specie ufficialmente riconosciuta;
- la presenza di identità del 100% con i *type strain* di più di una specie indica che la regione sequenziata non è sufficientemente discriminativa ed occorre procedere all'analisi di un'altra regione;
- l'identificazione del ceppo in esame è "probabile" nel caso che la sua sequenza sia 100% identica a quella del *reference strain* di una, e una sola, specie ufficialmente riconosciuta;
- se la sequenza del ceppo in esame presenta una similarità <100% ma >99% con quella di un *type strain*, di un *reference strain* o di un isolato clinico (non *type strain* e non *reference strain*), l'identificazione è "accettabile" solo se le caratteristiche fenotipiche delle due specie sono compatibili e previo sequenziamento di regioni alternative;
- se la sequenza del ceppo in esame presenta una similarità <99% con quella della specie più "vicina" è necessario sequenziare un'altra regione.

Controllo di qualità:

Il miglior controllo di qualità del sequenziamento consiste nell'analisi dei due filamenti *forward* e *reverse* della regione in esame e nella verifica della loro perfetta complementarità.

8.8. PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ

I laboratori di micobatteriologia sono tenuti a partecipare a un programma esterno di qualità per ogni aspetto della diagnostica erogata. Fra i programmi di *proficiency* disponibili in commercio, soltanto uno include la valutazione della performance delle metodiche impiegate per l'identificazione dei micobatteri: Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), <http://www.instand-ev.de>, spedisce otto ceppi all'anno recapitati in due invii. I tempi di risposta sono abbastanza ristretti (50 giorni circa).

L'abbonamento al suddetto programma fornisce un servizio con le seguenti caratteristiche: a) istruzioni complete per la ricostituzione e preparazione dei campioni che debbono essere trattati come normali campioni clinici; b) valutazione statistica dei risultati con relativo punteggio; c) garanzia dell'anonimato; d) invio di un certificato di partecipazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Adékambi T., Colson P., Drancourt M., *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:5699-5708.
2. Butler W.R., Guthertz L.S., *Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species*, 2001, *Clin Microbiol Rev*; 14:704-726.
3. CDC, *Standardized method for HPLC identification of mycobacteria*, 1996, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.
4. El Khéchine A., Couderc C., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M., *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice*, 2011, *PLoS ONE* 6:e24720.
5. Kent P.T., Kubica G.P., *Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory*, 1985, US Department of Health and Human Services, Atlanta.
6. Kirschner P., Springer B., Vogel U., Meier A., Wrede A., Kiekenbeck M., Bange F.C., Böttger E.C., *Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:2882-2889.
7. Larsson L., Jantzen E., Johnson J., *Gas chromatographic fatty acids profiles for characterization of mycobacteria: an interlaboratory methodological evaluation*, 1985, *Eur J Clin Microbiol*; 4:483-487.
8. Lebrun L., Espinasse F., Poveda J.D., Vincent Lévy-Frébault V., *Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria*, 1992, *J Clin Microbiol*; 30:2476-2478.
9. Lotz A., Ferroni A., Beretti J.L., Dauphin B., Carbonelle E., Guet-Ravillet H., Veziris N., Heym B., Jarlier V., Gaillard J.L., Pierre-Audigier C., Frapy E., Berche P., Nassif X., Bille E., *Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry*, 2010, *J Clin Microbiol*; 48:4481-4486.
10. McNabb A., Eisler D., Adie K., Amos M., Rodrigues M., Stephens G., Black W.A., Isaac-Renton J., *Assessment of partial sequencing of the 65-kiloDalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources*, 2004, *J Clin Microbiol*; 42:3000-3011.
11. Minnikin D.E., Al-Shamaony L., Goodfellow M., *Differentiation of Mycobacterium, Nocardia, and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolysates*, 1975, *J Gen Microbiol*; 88:200-204.
12. Richter E., Weizenegger M., Rüsche-Gerdes S., Niemann S., *Evaluation of GenoType MTBC assay for differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:2672-2675.
13. Roth A., Fisher M., Hamid M.E., Michalke S., Ludwig W., Mauch H., *Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequence*, 1998, *J Clin Microbiol*; 36:139-147.
14. Russo C., Tortoli E., Menichella D., *Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species*, 2006, *J Clin Microbiol*; 44:334-339.
15. Saleeb P.G., Drake S.K., Murray P.R., Zelazny A.M., *Identification of mycobacteria in solid-culture media by*

- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:1790-1794.
16. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E.C., Bodmer T., *Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:175-178.
 17. Tortoli E., *Standard operating procedure for optimal identification of mycobacteria using 16S rRNA gene sequences*, 2010, *Standards Genom Sci*; 3(2):145-152.
 18. Tortoli E., Bartoloni A., *High-performance liquid chromatography and identification of mycobacteria*, 1996, *Rev Med Microbiol*; 7:207-219.
 19. Tortoli E., Mariottini A., Mazzarelli G., *Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:4418-4420.
 20. Tortoli E., Pecorari M., Fabio G., Messinò M., Fabio A., *Commercial DNA-probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species*, 2009, *J Clin Microbiol*; 48:307-310.
 21. Turenne C.Y., Tschetter L., Wolfe J., Kabani A., *Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species*, 2001, *J Clin Microbiol*; 39:3637-3648..

Capitolo 9

TEST DI SENSIBILITÀ

**Claudio Scarparo,
Lanfranco Fattorini**

9. TEST DI SENSIBILITÀ

Il bacillo tubercolare è intrinsecamente resistente alla grande maggioranza dei farmaci antibatterici di uso generale, mentre è normalmente sensibile a un ristretto numero di molecole, alcune delle quali non trovano altri impieghi terapeutici.

Fino agli anni '80 il saggio della sensibilità del bacillo tubercolare era considerato quasi superfluo, essendo i ceppi selvaggi (cioè quelli isolati da pazienti non trattati in precedenza con farmaci antitubercolari) sensibili a tutti i farmaci specifici. L'antibiogramma veniva pertanto eseguito solo nel caso in cui il paziente dimostrasse di non rispondere al trattamento, per appurare se si fossero sviluppate resistenze. In anni più recenti, l'isolamento sempre più frequente di ceppi resistenti e la crescente diffusione dei ceppi MDR (*multidrug resistant*, resistenti ad almeno isoniazide e rifampicina) e XDR (*extensively drug resistant*, resistenti, oltre che a isoniazide e rifampicina, ad almeno uno degli antitubercolari iniettabili di seconda scelta [amikacina, capreomicina e kanamicina] e ad almeno uno dei fluorochinoloni attivi sui micobatteri [ciprofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e ofloxacina]) ha provocato un brusco cambiamento di rotta (25). Attualmente l'antibiogramma è ritenuto indispensabile per tutti i ceppi di primo isolamento.

I micobatteri appartenenti a *Mycobacterium tuberculosis* complex e quelli non tubercolari differiscono anche per la sensibilità ai farmaci. Il saggio della sensibilità in questi ultimi è ancora ben lungi dall'essere stato messo a punto e viene eseguito solo limitatamente ad alcune specie e ad alcuni farmaci.

I metodi qualitativi, che utilizzano un'unica concentrazione di farmaco, definita "concentrazione critica", consentono di determinare se lo stipite micobatterico in esame è sensibile o resistente a tale molecola. La concentrazione critica di un farmaco antitubercolare è definita come la più bassa concentrazione in grado di inibire il 95% dei ceppi selvaggi appartenenti a *Mycobacterium tuberculosis* complex e contemporaneamente incapace di inibire i ceppi isolati da pazienti che non rispondono al trattamento col medesimo farmaco e che devono quindi essere considerati resistenti. Questo approccio si è dimostrato valido per il bacillo tubercolare perché i ceppi selvaggi presentano una notevole uniformità nel grado di sensibilità ai farmaci e perché le concentrazioni attive sui ceppi sensibili e resistenti sono nettamente differenti.

I metodi quantitativi consentono di misurare il grado di sensibilità determinando la concentrazione minima inibente (MIC), che corrisponde alla più bassa concentrazione del farmaco capace di inibire *in vitro* la crescita visibile della popolazione micobatterica in esame. La determinazione della MIC può essere importante per quelle specie caratterizzate da un ristretto intervallo tra sensibilità e resistenza a un determinato farmaco, in particolare per i micobatteri non tubercolari.

9.1. TEST DI SENSIBILITÀ PER *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX

Il test di sensibilità dovrebbe essere eseguito su tutti i ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* complex di primo isolamento utilizzando i farmaci di prima linea (etambutolo, isoniazide, pirazinamide e rifampicina) e dovrebbe essere ripetuto se, dopo 2-3 mesi di terapia, le colture del paziente continuano ad essere positive (4, 23, 29). La streptomina, considerata fino a qualche anno fa antibiotico di prima linea,

è stata declassata a farmaco di seconda scelta dai CDC, ma non dall'OMS; il suo inserimento nell'antibiogramma ha un senso solo per i laboratori a cui afferiscono reparti che includono tale farmaco nel protocollo terapeutico. I farmaci di seconda linea (amikacina, capreomicina, kanamicina, ofloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, etionamide, linezolid, pAS e rifabutina) dovrebbero essere testati solo in presenza di resistenze accertate a quelli di prima linea e solo in Laboratori di Riferimento.

Per il saggio della sensibilità del bacillo tubercolare ai farmaci esistono tre diversi approcci: il metodo delle proporzioni, il metodo delle concentrazioni assolute e il metodo del rapporto di resistenza (*resistance-ratio*). Tutti e tre forniscono risultati clinicamente utili (1, 2).

Il metodo delle proporzioni, il più largamente impiegato, è considerato il sistema di riferimento.

Il razionale di tale metodo si basa sull'osservazione empirica secondo la quale, se in una popolazione micobatterica è presente più dell'1% di mutanti resistenti a un farmaco, tale popolazione è da considerarsi resistente, in quanto la percentuale suddetta è destinata ad aumentare rapidamente per effetto della pressione selettiva esercitata da un trattamento chemioterapico che utilizzi il farmaco in questione (2). Si definisce resistente un ceppo che presenti una riduzione del grado di sensibilità tale da differenziarlo inequivocabilmente da un ceppo selvaggio.

9.1.1. I FARMACI ANTITUBERCOLARI

I farmaci in polvere da utilizzare per il saggio di sensibilità possono essere richiesti alle industrie farmaceutiche produttrici o essere acquistati; è sconsigliato l'utilizzo di preparazioni farmaceutiche per uso clinico. Dopo l'apertura dei flaconi, le polveri devono essere conservate, chiuse in un essiccatore, a -20 °C o secondo le raccomandazioni del produttore. Di ciascun farmaco devono essere note la potenza e la data di scadenza. La potenza corrisponde alla quantità di farmaco attivo, espressa in percentuale; essa non è quasi mai pari al 100% e varia da lotto a lotto. Qualora la potenza non sia riportata direttamente, saranno riportate la purezza, il contenuto di acqua e la frazione attiva del farmaco (nel caso in cui il farmaco venga fornito come sale invece che libero). La potenza del farmaco può essere calcolata secondo la formula:

$$\text{Potenza (\%)} = \text{Purezza (\%)} \times \text{Frazione attiva (\%)} \times (1 - \text{Contenuto \% di acqua})$$

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

$$\text{Peso (mg)} = \text{Volume del solvente (mL)} \times \text{Concentrazione desiderata (\mu\text{g/mL})} / \text{Potenza (\%)}$$

$$\text{Volume (mL)} = \text{Peso (mg)} \times \text{Potenza (\%)} / \text{Concentrazione desiderata (\mu\text{g/mL})}$$

Partendo dal farmaco in polvere, la soluzione madre va preparata a una concentrazione non inferiore a 1000 µg/mL (preferibilmente 10.000 µg/mL). Essa deve essere sterilizzata mediante filtrazione (pori da 0,2 µm), avendo cura di scartare la prima parte del filtrato (10-15%). Alcuni farmaci non sono solubili in acqua e richiedono solventi diversi, quali metanolo, etanolo o dimetil-solfossido; in questi casi si deve utilizzare la minima quantità di solvente necessaria a sciogliere la polvere, usando poi acqua distillata o tampone fosfato come diluenti per raggiungere la concentrazione di lavoro (normalmente tale rapporto è di una parte di solvente e nove parti di diluente). Le soluzioni preparate con i solventi succitati sono autosterilizzanti. Le soluzioni madre possono essere conservate per più di 12 mesi, senza significativa perdita di attività, a -70 °C, in piccole aliquote dispensate in *vial* di polipropilene o polietilene. Le soluzioni, una volta scongelate, devono essere utilizzate in

giornata; la porzione di farmaco non usata non può essere congelata nuovamente e va eliminata (4). Alcuni farmaci possono essere anche conservati alle concentrazioni e alle temperature indicate di seguito: capreomicina: 1000 µg/mL a -20 °C; etambutolo: 5000 µg/mL a 3-7 °C; isoniazide: 200 µg/mL a 3-7 °C; kanamicina: 500 µg/mL a -20 °C; streptomina: 2000 µg/mL a 2-8 °C; pAS: 2000 µg/mL a 3-7 °C (8). In ogni caso è doveroso attenersi alle indicazioni fornite dal produttore.

Nella tabella I sono riportate le concentrazioni raccomandate per il saggio nei diversi terreni.

La pirazinamide è attiva contro il bacillo tubercolare solo a pH 5,5 o inferiore. La scarsa adattabilità della maggior parte dei ceppi a tali valori di pH rende problematica l'esecuzione dei test di sensibilità per questo farmaco, in particolar modo sui terreni solidi (3, 14, 18, 29).

Tab. I - CONCENTRAZIONI CRITICHE RACCOMANDATE PER IL SAGGIO DI SENSIBILITÀ NEI CONFRONTI DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX^a.

Farmaco	Solvente	Concentrazione nei vari terreni/sistemi (µg/mL)				
		MGIT 960	VersaTREK	L-J	7H10	7H11
Isoniazide	ADS	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2
		0,4	0,4	1,0	1,0	1,0
Rifampicina	DMSO	1,0	1,0	40	1,0	1,0
Etambutolo	ADS	5,0	5,0	2,0	5,0	7,5
		7,5	8,0	6,0	10	–
Pirazinamide	ADS	100	300	–	–	–
Streptomina	ADS	1,0	–	4,0	2,0	2,0
		4,0	–	–	10	10
Capreomicina	ADS	2,5	–	40	10 ^b	10
Etionamide	DMSO	5,0	–	40	5,0	10
Protionamide	DMSO	2,5	–	40	–	–
Kanamicina	ADS	2,5	–	30	5,0	6,0
Amikacina	ADS	1,0	–	– ^b	4,0	–
Ofloxacina	NaOH 0,1N	2,0	–	2,0 ^b	2,0	2,0
Ciprofloxacina	NaOH 0,1N	1,0	–	2,0	2,0	2,0
Moxifloxacina	ADS	0,25 ^b	–	–	0,5 ^b	0,5
Levofloxacina	NaOH 0,1N	2,0 ^b	–	–	1,0	–
pAS	ADS	– ^b	–	1,0	2,0	8,0
Clofazimina	DMSO	–	–	–	1,0	–
Rifabutina	Metanolo	0,5	–	–	0,5	0,5
Linezolid	ADS	1,0	–	–	–	–

^a L-J, Löwenstein-Jensen; 7H10, Middlebrook 7H10; 7H11, Middlebrook 7H11; pAS, acido p-amminosalicilico; ADS, acqua distillata sterile; DMSO, dimetil-solfossido.

^b Nuove indicazioni per l'esecuzione dei test di sensibilità per *Mycobacterium tuberculosis complex* sono state elaborate da un gruppo di esperti dell'OMS, ma non ancora pubblicate. Alcuni *breakpoint* risultano diversi rispetto a quelli precedentemente pubblicati dalla stessa OMS e dal CLSI. Le nuove proposte sono: amikacina 30 mg/mL su terreno L-J; ofloxacina 4 mg/mL su terreno L-J; capreomicina 4 mg/mL su terreno 7H10; levofloxacina 1,5 mg/mL nel sistema MGIT 960; moxifloxacina (due concentrazioni) 0,5 e 2 mg/mL sia su terreno 7H10 che nel sistema MGIT 960; pAS 4 mg/mL nel sistema MGIT 960.

9.1.2. SAGGIO DI SENSIBILITÀ SU TERRENO SOLIDO (METODO DELLE PROPORZIONI)

Principio:

Una sospensione standardizzata del ceppo in esame viene inoculata su una serie di terreni solidi contenenti i singoli farmaci nonché su un terreno di controllo. La stessa sospensione, diluita 1/100, viene inoculata su una seconda serie di terreni contenenti i singoli farmaci e su un secondo terreno di controllo. La lettura viene eseguita utilizzando soltanto una delle due serie di terreni: quella che presenta, sul controllo, un numero di colonie compreso fra 50 e 500. Si calcola la proporzione fra il numero delle colonie cresciute su ciascun terreno antibiotato e il numero di quelle presenti sul controllo.

Il criterio dell'1% viene utilizzato per determinare la sensibilità o la resistenza (11). Il metodo non è utilizzabile per la pirazinamide.

Per il test di sensibilità del bacillo tubercolare possono essere utilizzati sia terreni a base di uovo, quale il Löwenstein-Jensen, sia i terreni agarizzati Middlebrook 7H10 e 7H11. I terreni all'uovo sono i meno indicati perché i farmaci vengono parzialmente inattivati, sia durante la solidificazione a 85 °C del *medium*, sia dal legame con i fosfolipidi, le proteine e certi aminoacidi presenti nel terreno. Il metodo delle proporzioni su terreno Middlebrook 7H10 addizionato con acido oleico, albumina, destrosio e catalasi (OADC) è attualmente considerato il test di riferimento (14). Per i ceppi farmaco-resistenti, la cui crescita può risultare stentata in Middlebrook 7H10, è possibile ricorrere all'utilizzo del terreno Middlebrook 7H11 che contiene anche idrolisato di caseina (9, 29).

9.1.2.1. SAGGIO SU TERRENO A BASE DI UOVO

Reagenti:

- Due serie di tubi di Löwenstein-Jensen con farmaci incorporati;
- Due tubi di Löwenstein-Jensen senza farmaci;
- Brodo Middlebrook 7H9;
- Una piastra di agar cioccolato ed una di Middlebrook 7H10.

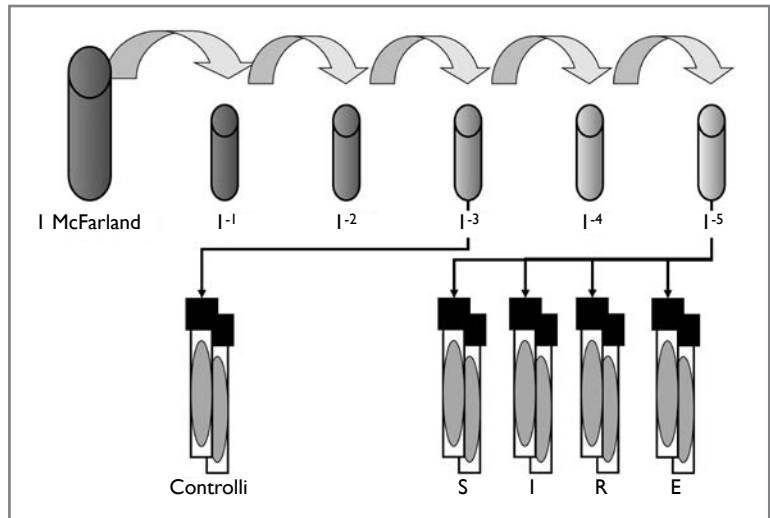
I terreni con i farmaci incorporati esistono in commercio prodotti da varie ditte ma, a causa della rapida diminuzione dell'attività dei farmaci, se ne consiglia la preparazione in laboratorio. I farmaci, le cui concentrazioni sono riportate nella tabella I, devono essere aggiunti al terreno prima delle uova, agitando per ottenere un'uniforme distribuzione. Dopo l'aggiunta delle uova e del verde malachite, occorre distribuire il terreno in provette sterili da incubare per 45 minuti in coagulatore a 85 °C in posizione inclinata. I tubi devono essere conservati a 4 °C.

Procedimento:

- prelevare 5-10 colonie e trasferirle in una provetta sterile con tappo a vite contenente 4 mL di brodo Middlebrook 7H9 e alcune palline di vetro;
- vortexare per almeno 5 minuti e lasciare sedimentare le particelle più grossolane per circa 30 minuti;
- aspirare il sopranatante e trasferirlo in una seconda provetta aggiustando poi, con brodo Middlebrook 7H9, la torbidità della sospensione allo standard n. 1 di McFarland;
- preparare diluizioni 10^{-3} e 10^{-5} di tale sospensione con acqua distillata sterile (0,5 mL di sospensione in 4,5 mL di acqua distillata);
- inoculare la prima serie di terreni con 0,2 mL della soluzione 10^{-3} ;
- inoculare la seconda serie di terreni con 0,2 mL della diluizione 10^{-5} ;

- inoculare una piastra di agar cioccolato e una di Middlebrook 7H10 con una goccia della sospensione non diluita (fig. 9.1);
- incubare i tubi a 37 °C, per alcuni giorni in posizione inclinata e con il tappo allentato e, quando sono ben asciutti, in posizione verticale con il tappo ben avvitato;
- controllare, per qualche giorno, la sterilità della piastra di agar cioccolato per confermare la purezza dell'inoculo;
- esaminare la piastra di Middlebrook 7H10 per tutta la durata del test per accertarsi che non si tratti di una coltura mista. In presenza di contaminazione o di colture miste occorre ripetere il test.

Fig. 9.1 - TEST DI SENSIBILITÀ SU TERRENO ALL'UOVO.



Letture e interpretazione:

Per l'interpretazione dei risultati deve essere utilizzata la serie di terreni che presenta, sul tubo del controllo, un numero contabile di colonie non <50 (che può essere responsabile di false sensibilità) né >500 (possibile causa di false resistenze). In presenza di crescita confluyente l'interpretazione è possibile solo in presenza di sensibilità a tutti i farmaci. In tutti gli altri casi il test deve essere ripetuto.

La prima lettura si esegue dopo 28 giorni e la seconda dopo 42 giorni. La prima lettura è definitiva solo per i farmaci verso i quali il ceppo risulta resistente. Per determinare la sensibilità o la resistenza del ceppo a ogni singolo farmaco occorre calcolare il rapporto, in percentuale, fra il numero di colonie cresciute sul terreno col farmaco e il numero di colonie cresciute sul terreno di controllo. Il ceppo è considerato resistente quando tale percentuale è $\geq 1\%$ e sensibile quando essa è $<1\%$. Quando un antibiotico è presente a due diversi dosaggi, e solo il più alto è in grado di inibire la crescita, la sensibilità può essere refertata come intermedia. Dal punto di vista epidemiologico, tuttavia, il ceppo è da considerarsi resistente.

Una versione semplificata del metodo prevede l'inoculo, utilizzando la sospensione diluita 10^{-3} , di una sola serie di terreni contenenti i farmaci, nonché di due coppie di controlli usando rispettivamente le diluizioni 10^{-3} e 10^{-5} . La lettura si effettua al 28° giorno. Se il numero di colonie presenti

sul terreno di controllo inoculato con diluizione 10^{-3} è troppo abbondante, il loro numero viene estrapolato moltiplicando per 100 il numero delle colonie sviluppatesi sul controllo inoculato con la diluizione 10^{-5} . I risultati ottenuti con questa tecnica semplificata sono comparabili a quelli ottenuti col metodo precedente (25).

9.1.2.2. SAGGIO SU TERRENI AGARIZZATI

Reagenti:

- Piastre di Petri divise in quadranti;
- Farmaci in polvere oppure, in alternativa, dischi impregnati con i farmaci (BBL Sensi-Disc, Becton Dickinson);
- Terreno Middlebrook 7H10 addizionato con supplemento OADC, mantenuto liquido in bagnomaria a 50-56 °C;
- Una piastra di agar cioccolato e una di Middlebrook 7H10.

Procedimento:

Per ogni ceppo viene utilizzata una serie di piastre comprendenti, nei vari quadranti, rispettivamente il terreno di controllo (senza farmaco) e i terreni contenenti i singoli farmaci a concentrazioni adeguate.

PREPARAZIONE DEL TERRENO UTILIZZANDO FARMACI IN SOLUZIONE

- distribuire 5 mL di terreno senza farmaco, che funge da controllo, in un quadrante di ciascuna piastra di Petri;
- per ciascun antibiotico aggiungere, a un opportuno volume di terreno liquido contenente l'arricchimento, la quantità di farmaco occorrente per ottenere la concentrazione finale necessaria (tab. 1);
- distribuire 5 mL di tali terreni nei rimanenti quadranti in modo che in ogni serie di piastre ciascun quadrante contenga l'adeguata concentrazione di un singolo antibiotico;
- lasciare solidificare l'agar a temperatura ambiente e poi stoccare, per non oltre un mese, in buste di plastica, al buio, a 4 °C.

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

PREPARAZIONE DEL TERRENO UTILIZZANDO DISCHETTI IMPREGNATI DI FARMACO

- distribuire 5 mL di terreno senza farmaco, che funge da controllo, in un quadrante di ciascuna piastra di Petri;
- deporre i dischetti nei quadranti rimanenti (tab. 2) e ricoprirli con 5 mL di terreno liquefatto in modo che, in ogni serie di piastre, ciascun quadrante contenga l'adeguata concentrazione di un singolo antibiotico;
- lasciare solidificare l'agar a temperatura ambiente;
- incubare le piastre per una notte a 37 °C per facilitare la diffusione dei farmaci nel terreno;
- stoccare, per non oltre un mese, in buste di plastica, al buio, a 4 °C.

INOCULO E INCUBAZIONE

- prelevare 5-10 colonie e trasferirle in una provetta sterile con tappo a vite contenente 4 mL di brodo Middlebrook 7H9 e alcune palline di vetro;
- vortexare per almeno 5 minuti e lasciare sedimentare le particelle più grossolane per circa 30 minuti;

Tab. 2 - CONCENTRAZIONE DEGLI ANTIBIOTICI NEL METODO AGAR-ELUIZIONE.

Piastra	Quadrante	Farmaco	Concentrazione del farmaco ($\mu\text{g/mL}$)	
			nel dischetto	nel terreno
1	I	Controllo 1	–	–
	II	Isoniazide	1	0,2
	III	Isoniazide	5	1
	IV	Etambutolo	25	5
2	I	Controllo 2	–	–
	II	Streptomicina	10	2
	III	Streptomicina	50	10
	IV	Rifampicina	5	1

- aspirare il supernatante e trasferirlo in una seconda provetta aggiustando poi, con brodo Middlebrook 7H9, la torbidità della sospensione allo standard n. 1 di McFarland;
- preparare diluizioni 10^{-2} e 10^{-4} , con acqua distillata sterile, dalla sospensione suddetta (0,5 mL di sospensione madre in 4,5 mL di acqua distillata);
- accertarsi che la superficie del terreno da inoculare sia asciutta, asportando eventuali gocce di condensa con un tampone sterile;
- inoculare i vari quadranti di una prima serie di piastre con la sospensione 10^{-2} , usando una pipetta Pasteur e ponendo, senza toccare l'agar, una goccia ai tre angoli di ciascun quadrante. Tenere la pipetta perpendicolare al terreno per far sì che le gocce siano di grandezza uniforme e fare attenzione che queste non tocchino il bordo della piastra, dove la conta delle colonie risulterebbe difficoltosa;
- inoculare nello stesso modo una seconda serie di terreni usando la diluizione 10^{-4} ;
- inoculare una piastra di agar cioccolato ed una di Middlebrook 7H10 con 1-2 gocce della sospensione non diluita;
- lasciare asciugare le piastre inoculate, non capovolte, a temperatura ambiente, sotto cappa di sicurezza biologica, per circa un'ora;
- chiudere le piastre in buste di polietilene permeabile alla CO_2 e porle a 37°C in atmosfera contenente CO_2 al 5-10% (fig. 9.2).

LETTURA E INTERPRETAZIONE

- tenere sotto controllo per qualche giorno la piastra di agar cioccolato per verificare la purezza dell'inoculo, ed esaminare la piastra di Middlebrook 7H10 per tutta la durata del test, per escludere la presenza di colture miste. In presenza di contaminazione o di colture miste ripetere il test;
- esaminare le due serie di piastre settimanalmente e leggere quella in cui il quadrante di controllo presenta un numero contabile di colonie. Eventuali resistenze possono essere refertate immediatamente; la risposta relativa agli antibiotici a cui il ceppo è sensibile può essere data soltanto allo scadere della terza settimana di incubazione;

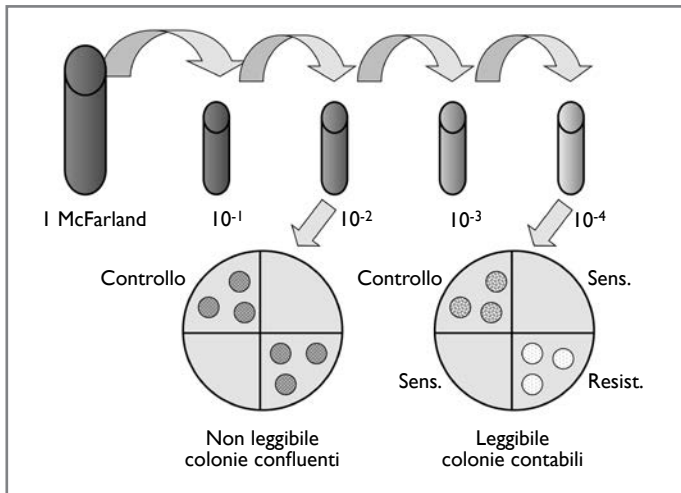


Fig. 9.2 - TEST DI SENSIBILITÀ SU TERRENO AGARIZZATO.

- determinare, sulla serie di piastre scelta per la lettura, la media del numero di colonie cresciute in ciascuna delle tre gocce seminate in ogni quadrante facendo attenzione alla presenza di microcolonie, evidenziabili con lo stereomicroscopio o con il microscopio ottico, osservando la piastra capovolta ad ingrandimento 10x;
- calcolare la percentuale delle colonie cresciute sul terreno col farmaco rispetto a quelle cresciute sul terreno di controllo. Interpretare il risultato come resistente quando tale percentuale è $\geq 1\%$ e come sensibile quando è $< 1\%$.

È possibile interpretare i risultati soltanto se il test presenta, sul quadrante di controllo, un numero contabile di colonie (mediamente 50-100). Se il controllo presenta un numero di colonie < 50 oppure > 500 il test non è interpretabile (possibilità rispettivamente di false sensibilità o di false resistenze) e deve essere ripetuto. In presenza di crescita confluenta il test può essere considerato valido solo se il ceppo risulta sensibile a tutti i farmaci; se invece si evidenziano resistenze il test deve essere ripetuto (possibilità di false resistenze dovute all'inoculo troppo pesante) (4, 14). Quando un antibiotico è presente a due diversi dosaggi, e solo il più alto di questi è in grado di inibire la crescita micobatterica, può essere refertata una sensibilità intermedia; dal punto di vista epidemiologico, tuttavia, il ceppo è da considerarsi resistente.

9.1.2.3. SAGGIO DIRETTO SU TERRENI SOLIDI

Principio:

Oltre che con la metodica indiretta (da coltura), il test di sensibilità può essere eseguito direttamente, previa decontaminazione, sui campioni positivi all'esame microscopico. Possono essere impiegati sia terreni all'uovo che agarizzati.

Procedimento:

- in base al numero di bacilli alcol-acido-resistenti osservati per campo microscopico, può essere necessario diluire, con acqua distillata sterile, il campione decontaminato e concentrato, secondo lo schema riportato in tabella 3;
- inoculare una serie completa di terreni (Löwenstein-Jensen o piastre di Middlebrook 7H10),

- comprendente i terreni con gli antibiotici alle concentrazioni appropriate e un terreno di controllo (senza farmaci), con l'ideale diluizione del campione;
- incubare, leggere e interpretare il test utilizzando la stessa procedura descritta per il corrispondente metodo indiretto (su Löwenstein-Jensen o su terreno agarizzato);
 - se lo sviluppo sui terreni di controllo è insufficiente, se il test è contaminato o si è in presenza di colture miste, ripetere il test con il metodo indiretto (14).

Tab. 3 - DILUIZIONE DEL CAMPIONE PER IL SAGGIO DELLA SENSIBILITÀ DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX CON IL METODO DIRETTO.

Numero di micobatteri per campo microscopico		Diluizioni finali
colorazione con fucsina basica (1000x)	colorazione con fluorocromi (400x)	
<2	<25	Non diluita
1-5	25-50	Non diluita, 10 ⁻¹
5-10	50-250	Non diluita, 10 ⁻²
>10	>250	10 ⁻² , 10 ⁻³

9.1.3. SAGGIO DI SENSIBILITÀ SUL TERRENO MGIT (MANUALE)

Principio:

Il saggio qualitativo della sensibilità ai farmaci antimicobatterici streptomina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo può essere eseguito con il sistema MGIT manuale (Becton Dickinson). Con una stessa sospensione micobatterica standardizzata si inoculano una serie di provette MGIT addizionate con le opportune concentrazioni dei singoli farmaci nonché una provetta di controllo, senza farmaci. Le provette vengono incubate e lette giornalmente per rilevare l'eventuale sviluppo di fluorescenza. La comparsa di fluorescenza in una provetta contenente il farmaco, entro 3 giorni dalla positivizzazione della provetta di controllo, indica che il ceppo è da considerarsi resistente.

Reagenti:

- Cinque provette MGIT 4 mL;
- Supplemento MGIT OADC;
- MGIT AST SIRE, comprendente streptomina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo;
- Una piastra di agar cioccolato e una di Middlebrook 7H10;
- Controllo positivo: provetta contenente 5 mL di solfito di sodio allo 0,4% (conservabile a temperatura ambiente per 4 settimane) che è fluorescente se esposta ai raggi ultravioletti;
- Controllo negativo: provetta MGIT non inoculata.

Procedimento:

Per i particolari tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

9.1.4. SAGGIO DI SENSIBILITÀ CON IL SISTEMA AUTOMATICO MGIT 960

Principio:

Il test di sensibilità eseguito con il sistema automatico MGIT 960 (Becton Dickinson) differisce da quello eseguito manualmente (9.1.3.) per l'impiego di provette da 7 mL (anziché da 4 mL) e per

la possibilità di testare anche la pirazinamide, nonché in quanto il rilevamento della fluorescenza e l'interpretazione dei risultati avvengono in maniera automatizzata. Il sistema MGIT 960 è validato dalla FDA e venduto in Europa con il marchio CE per l'esecuzione del test di sensibilità qualitativo nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis* complex per i farmaci di prima linea (7, 16, 20). Il sistema usa un algoritmo, basato sul principio del metodo delle proporzioni, per comparare le cinetiche di crescita in assenza e in presenza di farmaco e per interpretarle in termini di sensibilità e di resistenza.

Reagenti:

- MGIT SIRE kit: contenente i farmaci streptomina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo a bassa concentrazione (concentrazione critica) e il relativo supplemento;
- Farmaci liofilici streptomina, isoniazide, etambutolo ad alta concentrazione in confezione singola;
- Pirazinamide kit: contenente il farmaco e il relativo supplemento;
- Provette MGIT 7 mL;
- Provette MGIT 7 mL a pH 5,9.

Procedimento:

Le procedure operative del sistema MGIT 960 (figg. 9.3 e 9.4) implicano un primo test di sensibilità dei ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* complex ai farmaci streptomina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo a concentrazione critica (streptomina: 1,0 µg/mL, isoniazide: 0,1 µg/mL, rifampicina: 1,0 µg/mL, etambutolo: 5,0 µg/mL e pirazinamide: 100 µg/mL). In presenza di resistenze a isoniazide, etambutolo e streptomina è possibile eseguire un secondo test utilizzando le concentrazioni più elevate: isoniazide: 0,4 µg/mL, etambutolo: 7,5 µg/mL, streptomina 4,0 µg/mL.

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

9.1.5. SAGGIO DI SENSIBILITÀ CON IL SISTEMA AUTOMATICO VERSATREK

Principio:

Il sistema VersaTREK (TREK Diagnostic Systems) è validato dalla FDA e venduto in Europa con il marchio CE per l'esecuzione del test di sensibilità qualitativo sui ceppi appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex per isoniazide, rifampicina, etambutolo e pirazinamide.

La tecnologia di rilevazione della crescita è basata sul monitoraggio continuo della pressione del gas all'interno dei flaconi.

Reagenti:

- VersaTREK Myco Culture bottle;
- VersaTREK Myco GS, supplemento di crescita;
- VersaTREK Myco Susceptibility kit contenente i farmaci liofilici (isoniazide, rifampicina ed etambutolo) e i relativi diluenti;
- Pirazinamide;
- Tampone acido.

Procedimento:

Ogni flacone che viene utilizzato per il test di sensibilità, dopo l'aggiunta dell'apposito supplemento di crescita, va inoculato con una sospensione batterica standardizzata. Le concentrazioni finali degli antibiotici nei flaconi sono le seguenti: isoniazide: 0,1 µg/mL, rifampicina: 1,0 µg/mL,

etambutolo: 5,0 µg/mL. Isoniazide ed etambutolo possono essere saggiati anche alle concentrazioni di 0,4 µg/mL e 8,0 µg/mL. Per i flaconi contenenti antibiotico e per il controllo viene utilizzato lo stesso inoculo.

Per la pirazinamide (liofilo da ricostituire con tampone acido) la concentrazione finale è di 300 µg/mL.

Il sistema non prevede l'interpretazione dei risultati in automatico. Dal momento in cui lo strumento segnala la positivizzazione del flacone di controllo, i flaconi con i farmaci devono essere monitorati per ulteriori tre giorni. Un isolato viene definito "sensibile" a un determinato farmaco se il corrispondente flacone rimane negativo per i tre giorni successivi alla positivizzazione del controllo. Per isoniazide, rifampicina ed etambutolo il test può richiedere da 4 a 13 giorni; per la pirazinamide, da 4 a 15 giorni (5, 13).

Per il dettaglio della procedura si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

9.1.6. SAGGIO DI SENSIBILITÀ AI FARMACI DI SECONDA SCELTA

Principio:

Il metodo di riferimento per l'esecuzione del saggio di sensibilità ai farmaci di seconda scelta (capreomicina, etionamide, kanamicina, amikacina, ofloxacina, pAS, rifabutina e altri) è quello delle proporzioni in agar (14, 15, 19), già descritto al punto 9.1.2.2. La tabella I riporta le concentrazioni da utilizzare per i terreni Middlebrook 7H10 e 7H11.

Recentemente è stato proposto un protocollo per l'antibiogramma, esteso ai farmaci di seconda scelta (12, 17, 21, 27), basato sull'utilizzo del sistema MGIT 960. È richiesto il collegamento dello strumento a un computer con i software EpiCenter e TB eXiST (Becton Dickinson) (22). TB eXiST offre all'operatore il controllo continuo (sia numerico che grafico) della crescita dei micobatteri a contatto con il farmaco. Partendo da una coltura in MGIT è possibile effettuare simultaneamente l'antibiogramma ai farmaci di prima e di seconda linea e anche testare nuove molecole; di ciascun farmaco è possibile saggiare più concentrazioni.

La determinazione della sensibilità ai farmaci di seconda linea mediante il sistema MGIT 960 è raccomandata dal Clinical and Laboratory Standard Institute (4) e dall'OMS (24).

Principio:

Analogamente al saggio di sensibilità ai farmaci di prima linea (9.1.4.), il test relativo a quelli di seconda linea si basa sul principio del metodo delle proporzioni. L'associazione preventiva del codice a barre, presente su ciascuna provetta MGIT, con i dati del paziente e con i farmaci da saggiare, permette di stampare tutte le etichette necessarie a collegare al paziente e al farmaco in esame tutti i tubi MGIT utilizzati.

TB eXiST memorizza l'indice di crescita delle provette contenenti i singoli farmaci al momento in cui il controllo raggiunge il valore di soglia prefissato.

Reagenti:

- Provette MGIT 7 mL;
- Supplemento MGIT OADC;
- Farmaci: kanamicina, amikacina, capreomicina, ofloxacina, moxifloxacina, etionamide, linezolid ed eventualmente altri.

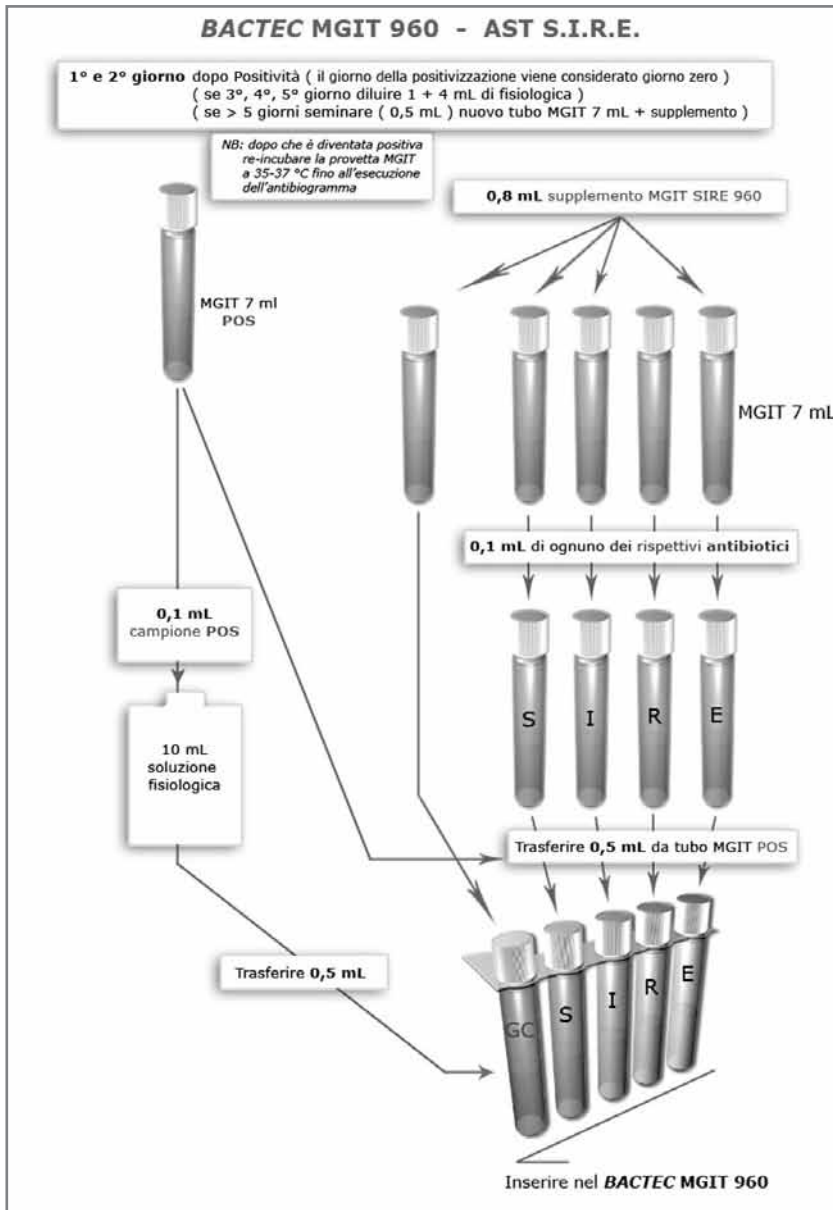


Fig. 9.3 - TEST DI SENSIBILITÀ SIRE CON IL SISTEMA MIGIT 960.

Procedimento:

- analogamente a quanto indicato per il saggio degli antibiotici di prima scelta (9.1.4.), preparare i tubi per il test di sensibilità aggiungendo il supplemento e i farmaci da testare alle concentrazioni prestabilite (tab. I);
- applicare sulle provette le corrispondenti etichette prodotte da TB eXiST (evitando di coprire il codice a barre presente su ciascun tubo);

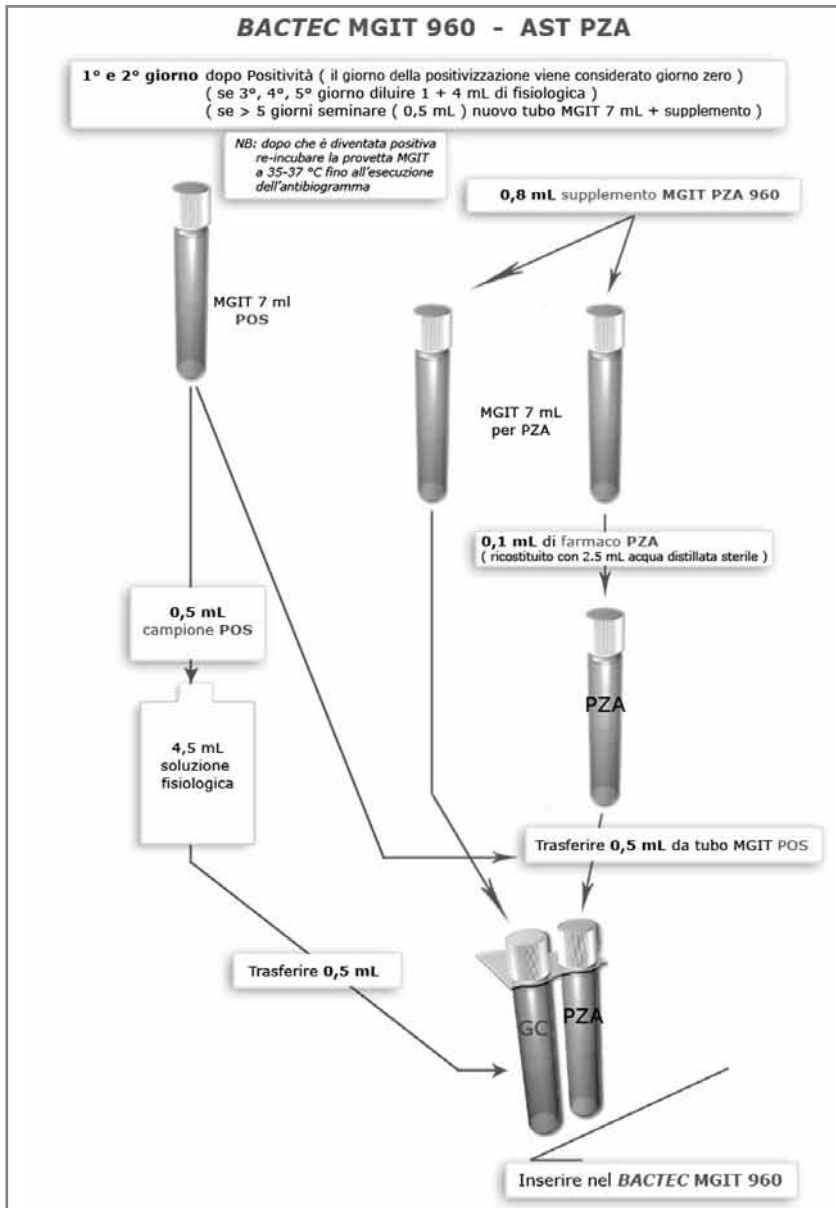


Fig. 9.4 - TEST DI SENSIBILITÀ ALLA PIRAZINAMIDE CON IL SISTEMA MGIT 960.

- inoculare provette antibiotate e controllo come previsto per il saggio delle molecole di prima scelta (9.1.4.);
- inserire i tubi nello strumento MGIT, leggendo in sequenza i codici a barre della provetta MGIT e dell'etichetta; tutte le provette che fanno parte dello stesso test devono essere inserite nello stesso cassetto.

Il sistema MGIT 960 controlla ogni 60 minuti lo stato di crescita all'interno di ogni singola provetta e trasmette l'informazione a EpiCenter. È possibile, richiedendo la lista di lavoro, consultare i dati in tempo reale e rilevare, e comunicare, eventuali resistenze prima dello scadere del protocollo. Per interpretare i dati è necessario che il controllo di crescita abbia raggiunto un valore >400 GU (unità di crescita); a questo punto il ceppo sarà da considerare resistente ai farmaci contenuti nei tubi con GU \geq 100 e sensibile a quelli contenuti nei tubi con GU <100.

Il referto può essere stampato direttamente da EpiCenter o inviato al sistema informatico del laboratorio.

9.1.7. CONTROLLO DI QUALITÀ

Un elemento critico del controllo di qualità è rappresentato dall'utilizzo di ceppi di riferimento i cui risultati di sensibilità ai farmaci antitubercolari siano ben documentati. L'utilizzo del ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), sensibile a tutti i farmaci antitubercolari di prima linea, è attualmente raccomandato dal CLSI. L'utilizzo dei ceppi ATCC di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti rispettivamente a isoniazide, rifampicina, etambutolo e pirazinamide non rappresenta invece la scelta ideale, essendo essi caratterizzati da resistenza ad alte concentrazioni dei rispettivi farmaci. Il ceppo ideale per il controllo di qualità dei test che saggiano sia la concentrazione critica (bassa) che quella alta, dovrebbe essere resistente alla prima ma sensibile alla seconda. Un ceppo di riferimento con tali caratteristiche non è attualmente disponibile. Può essere utilizzato un ceppo isolato nella routine di laboratorio avente le sopraccitate caratteristiche; per motivi di biosicurezza, è sconsigliato l'utilizzo di ceppi MDR. Per il controllo di qualità dovrebbero essere utilizzati sia ceppi sensibili che resistenti ai vari farmaci, per monitorare il rischio di *major errors* e *very major errors* (16, 20).

Il controllo di qualità dovrebbe essere eseguito per ogni nuovo lotto di terreno o di farmaci e almeno una volta alla settimana in quei laboratori che eseguono i test di sensibilità giornalmente o settimanalmente, o in parallelo a ciascun test di sensibilità se questi vengono eseguiti più raramente. La sospensione del ceppo di controllo in brodo Middlebrook 7H9 può essere conservata congelata a -70 °C.

Per valutare la sterilità dei terreni si consiglia di incubare il 10% di ciascun nuovo lotto a 37 °C per 48 ore e di eliminare l'intero lotto in presenza di terreni contaminati (4); in caso di superamento del test i terreni usati per il controllo possono essere riutilizzati.

Qualora si decida di adottare un nuovo metodo per l'esecuzione dei test di sensibilità, un certo numero di test dovrebbe essere eseguito in parallelo con i metodi vecchio e nuovo. Successivamente, i risultati dei test di sensibilità dovrebbero essere controllati per alcuni mesi inviando i ceppi a un Centro di Riferimento.

9.1.8. CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO

I laboratori che eseguono la diagnostica micobatteriológica sono tenuti a partecipare a una valutazione esterna di qualità per ogni aspetto della diagnostica erogata. Fra i programmi di *proficiency* disponibili, i seguenti valutano la performance delle metodiche impiegate per il saggio di sensibilità del bacillo tubercolare:

- Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), <http://www.instand-ev.de>, spedisce dieci ceppi all'anno recapitati in due

inviati. I tempi di risposta sono abbastanza ristretti (un mese) e richiedono l'esecuzione del test di sensibilità ai farmaci di prima scelta (incluse streptomina e pirazinamide) sugli stipiti di *Mycobacterium tuberculosis* complex inviati. L'abbonamento al suddetto programma fornisce un servizio con le seguenti caratteristiche: a) istruzioni complete per la preparazione dei ceppi; b) valutazione statistica dei risultati con relativo punteggio; c) garanzia dell'anonimato; d) invio di un certificato di partecipazione;

- il Laboratorio Sopranazionale di Riferimento OMS per la sorveglianza della tubercolosi farmaco-resistente, Istituto Superiore di Sanità, Roma, <http://www.iss.it/mipi>, spedisce venti ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* complex ogni 2-3 anni (6). I tempi di risposta sono piuttosto lunghi (3-6 mesi) e richiedono l'esecuzione del test di sensibilità ai farmaci di prima scelta (esclusa la pirazinamide) e ai principali farmaci di seconda scelta (kanamicina, amikacina, capreomicina e ofloxacina) sugli stipiti inviati. La partecipazione a tale programma è gratuita.

9.2. TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI NON TUBERCOLARI A CRESCITA LENTA

Attualmente prevale la tendenza a considerare l'esecuzione del test di sensibilità sui micobatteri non tubercolari a crescita lenta di scarsa utilità clinica per una serie di motivi:

- la maggioranza degli isolamenti è clinicamente non significativa;
- non esistono metodiche standardizzate per l'esecuzione dell'antibiogramma;
- nella maggior parte dei casi non esiste alcuna correlazione fra i risultati ottenuti *in vitro* e la risposta del paziente al trattamento;
- esistono per le specie di più frequente isolamento protocolli terapeutici dimostratisi efficaci *in vivo* in molti studi controllati.

Secondo le indicazioni del CLSI, lo standard raccomandato per il test di sensibilità per i micobatteri non tubercolari a lenta crescita è la microdiluzione in brodo. Esistono sufficienti dati di letteratura sulla correlazione fra i risultati del test di sensibilità *in vitro* e l'*outcome* clinico solo per *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium marinum*, limitatamente a uno o pochissimi farmaci.

9.2.1. SAGGIO DI SENSIBILITÀ CON IL SISTEMA SENSITITRE

Principio:

Il metodo di microdiluzione in brodo *Sensititre* (TREK Diagnostic Systems) è commercialmente disponibile per il test di sensibilità dei micobatteri non tubercolari a lenta crescita, ed è provvisto di marchio CE per uso diagnostico *in vitro*. Il sistema permette la determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) utilizzando piastre a 96 pozzetti contenenti diluizioni per raddoppio di vari antibiotici allo stato liofilo (tab. 4).

Reagenti:

- Pannello *Sensititre*;
- Standard di torbidità McFarland 0,5;
- Provetta con acqua demineralizzata e sfere di vetro;
- Brodo Mueller-Hinton con aggiunta di cationi (CAMHB, *Sensititre*);

Tab. 4 - RANGE DI DILUIZIONE DEI DIVERSI FARMACI PER IL TEST DI SENSIBILITÀ DEI MICOBATTERI NON TUBERCOLARI A CRESCITA LENTA.

Farmaco	Range di diluizioni (µg/mL)
Claritromicina	0,06-64
Rifabutina	0,25-8
Etambutolo	0,5-16
Isoniazide	0,25-8
Moxifloxacina	0,125-8
Rifampicina	0,125-8
Trimetoprim/sulfametossazolo	0,12/2,38-8/152
Amikacina	1-64
Linezolid	1-64
Ciprofloxacina	0,125-8
Streptomina	0,5-32
Doxiciclina	0,125-8
Etionamide	0,3-10

- Supplemento di crescita OADC;
- Lettore a specchio.

Procedimento:

- prelevare con un'ansa 5-10 colonie dal terreno solido e trasferirle in una provetta sterile con tappo a vite contenente acqua distillata sterile e alcune palline di vetro; omogeneizzare al vortex per 15-20 secondi;
- lasciar sedimentare le particelle più grossolane per qualche minuto e trasferire parte del supernatante in una nuova provetta sterile con tappo a vite contenente acqua demineralizzata. Aggiustare la torbidità allo 0,5 dello standard McFarland. Può anche essere utilizzata, al posto della sospensione preparata da colonie, una coltura in brodo;
- trasferire 50 µL di sospensione nella provetta contenente 11 mL di brodo Mueller-Hinton con OADC al 5%. Si ottiene in tal modo un inoculo di 5×10^5 UFC/mL;
- invertire la provetta 8-10 volte. L'esecuzione dei passaggi suddetti deve essere completata entro 30 minuti;
- trasferire 100 µL in ciascun pozzetto entro 30 minuti. Il trasferimento può essere eseguito manualmente, con una micropipetta, o utilizzando l'AutoInoculatore/AIM (*Sensititre*);
- sigillare la piastra con pellicola adesiva, premendo bene per garantire un'adeguata tenuta, evitando altresì la formazione di pieghe;
- incubare la piastra a 35-37 °C per 7 giorni;
- depositare su una piastra di agar cioccolato una goccia della sospensione utilizzata per l'inoculo, per controllarne la purezza;
- se dopo 7 giorni la crescita nel pozzetto di controllo non è ottimale reincubare per un massimo di 14 giorni;

- leggere per primo il pozzetto di controllo positivo. Se questo non evidenzia crescita il risultato del saggio non è valido.

I risultati possono essere letti senza rimuovere la pellicola adesiva. La crescita appare come torbidità o come deposito di cellule sul fondo del pozzetto. La MIC corrisponde alla concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita visibile. Fanno eccezione le sulfonamidi, per le quali la MIC equivale alla concentrazione più bassa in grado di inibire l'80% della crescita presente nel pozzetto del controllo positivo.

L'interpretazione degli *endpoint* può risultare difficile, soprattutto perché i pozzetti negativi possono evidenziare un leggero precipitato correlato all'inoculo. Si consiglia di prendere familiarità con la lettura utilizzando dei ceppi per il controllo di qualità con MIC note.

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

9.2.2. SAGGIO DI SENSIBILITÀ PER *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX (MAC)

Il test di sensibilità sugli isolati di *Mycobacterium avium* complex (MAC) dovrebbe essere limitato alle seguenti situazioni:

- ceppi clinicamente significativi isolati da pazienti precedentemente trattati con macrolidi;
- ceppi isolati da pazienti che hanno sviluppato batteriemia in corso di profilassi con macrolidi;
- ceppi isolati da pazienti che sono andati incontro a recidiva mentre erano in terapia con macrolidi.

In ogni caso il ceppo di primo isolamento deve essere congelato e conservato in quanto, in caso di mancata risposta alla terapia, il test di sensibilità deve essere eseguito anche su di esso, oltre che sul ceppo di più recente isolamento, per verificare se un'eventuale resistenza si sia sviluppata durante il trattamento.

Il test di sensibilità dovrebbe essere ripetuto, dopo 3 mesi di terapia, nella forma disseminata, e dopo 6 mesi di terapia, nella malattia polmonare cronica, qualora la sintomatologia non migliori e la coltura risulti ancora positiva (4, 29).

Farmaci da testare:

Soltanto per i macrolidi (claritromicina e azitromicina) è stata dimostrata, in studi clinici controllati, una correlazione tra il risultato del test di sensibilità *in vitro* e la risposta alla terapia. Per entrambi i farmaci la resistenza insorge a seguito di mutazioni nel gene che codifica per il rRNA 23S; il test di sensibilità, il cui risultato è valido per entrambi, dovrebbe essere eseguito solo sulla claritromicina, presentando l'azitromicina problemi di solubilità (4).

In caso di resistenza ai macrolidi, o se il paziente non tollera la terapia con macrolidi, può essere considerata l'opportunità di saggiare come farmaci secondari la moxifloxacina e/o il linezolid, sebbene i dati della letteratura non siano sufficienti per stabilire se esista una correlazione tra i risultati ottenuti *in vitro* e l'*outcome* clinico.

Metodo:

Il metodo raccomandato per il test di sensibilità è la microdiluizione in brodo, utilizzando brodo Mueller-Hinton con aggiunta di cationi e OADC (9.2.1).

Il risultato del test deve essere interpretato in base alle indicazioni della tabella 5. I ceppi selvaggi sono generalmente sensibili ai macrolidi; qualora si riscontrino resistenza in un ceppo selvaggio occorre, oltre che ripetere il test, confermarne l'identificazione. Un risultato di sensibilità intermedia ai macrolidi può indicare una resistenza emergente che dovrebbe essere verificata testando gli eventuali isolati successivi (4).

Tab. 5 - CRITERI INTERPRETATIVI PER IL TEST DI SENSIBILITÀ MEDIANTE MICRODILUIZIONE IN BRODO DI *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX.

Farmaco	MIC (µg/mL)		
	sensibile	intermedio	resistente
Claritromicina	≤8	16	≥32
Moxifloxacina ^a	≤1	2	≥4
Linezolid ^a	≤8	16	≥32

^a Tentative breakpoint, da refertare come tali.

Controllo di qualità:

Mycobacterium avium complex ATCC 700898 è il ceppo raccomandato per il controllo di qualità.

Il range di accettabilità dei risultati in microdiluzione in brodo è, per la claritromicina, 0,5-2 µg/mL, per la moxifloxacina 0,25-2 µg/mL, e per il linezolid 4-16 µg/mL a pH 7,3-7,4. In alternativa può essere utilizzato *Mycobacterium marinum* ATCC 927; per quest'ultimo i range di accettabilità sono, per la claritromicina 0,25-1 µg/mL e per moxifloxacina e linezolid 1-4 µg/mL a pH 7,3-7,4.

Il controllo di qualità dovrebbe essere ripetuto su ogni nuovo lotto di terreno o di farmaco e, settimanalmente, in quei laboratori che eseguono il test di sensibilità almeno una volta a settimana. In caso di esecuzione meno frequente dovrebbe essere eseguito in parallelo ad ogni test (4).

9.2.3. SAGGIO DI SENSIBILITÀ PER *MYCOBACTERIUM KANSASII*

L'esecuzione di routine del test di sensibilità non è necessaria per i ceppi selvaggi di *Mycobacterium kansasii*. I farmaci solitamente utilizzati in terapia sono rifampicina, isoniazide ed etambutolo; la claritromicina può essere usata al posto dell'isoniazide, mentre la rifabutina sostituisce la rifampicina nei pazienti HIV-positivi in trattamento con inibitori delle proteasi. Il fallimento terapeutico è quasi sempre associato alla comparsa di resistenza alla rifampicina. Il test di sensibilità è quindi raccomandato solo nei pazienti che non rispondono o che presentano una scarsa risposta iniziale alla terapia. Non di meno, un test di iniziale di sensibilità a rifampicina e claritromicina è raccomandato dal CLSI e questo dovrebbe essere ripetuto se la coltura rimane positiva dopo altri 3 mesi di terapia. Gli isolati sensibili alla rifampicina lo sono anche alla rifabutina.

Il metodo da utilizzare è la microdiluzione in brodo, utilizzando brodo Mueller-Hinton con aggiunta di cationi e supplemento di crescita OADC (9.2.1.) con incubazione di 7-14 giorni a 37 °C (4).

Il risultato del test deve essere interpretato in base alle indicazioni della tabella 6.

Controllo di qualità:

Ceppi ATCC da utilizzare per il controllo di qualità del test di sensibilità di *Mycobacterium kansasii* alla rifampicina e relativi range di accettabilità dei risultati:

- *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478; range: ≤1 µg/mL;
- *Mycobacterium marinum* ATCC 927; range: ≤0,25-1 µg/mL;
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; range: 0,5-4 µg/mL.

I controlli di qualità dovrebbero essere eseguiti settimanalmente, qualora si esegua il test almeno una volta la settimana, oppure, in parallelo al test di sensibilità, in caso di esecuzione meno frequente (29).

Tab. 6 - BREAKPOINT DI RESISTENZA PER IL TEST DI SENSIBILITÀ MEDIANTE MICRODILUIZIONE IN BRODO DI *MYCOBACTERIUM KANSASII*.

Farmaci	MIC (µg/mL)
Clarithromicina ^a	>16
Rifampicina ^b	>1
Amikacina	>32
Ciprofloxacina ^c	>2
Etambutolo	>4
Isoniazide ^d	–
Linezolid	>16
Moxifloxacina	>2
Rifabutina	>2
Streptomina ^d	–
Trimetoprim/sulfametossazolo	>2/38

^a La claritromicina è il rappresentante di classe dei nuovi macrolidi.
^b Gli isolati sensibili alla rifampicina sono sensibili anche alla rifabutina.
^c La ciprofloxacina è il rappresentante di classe dei vecchi fluorochinoloni, ma non è rappresentativa dei nuovi (gatifloxacina, moxifloxacina).
^d I *breakpoint* di isoniazide e streptomina non sono ancora stati stabiliti per i micobatteri non tubercolari; riportare la MIC, senza interpretazione.

9.2.4. SAGGIO DI SENSIBILITÀ PER *MYCOBACTERIUM MARINUM*

L'esecuzione di routine del test di sensibilità di *Mycobacterium marinum* non è raccomandata. I farmaci utilizzabili in terapia sono: rifampicina, doxiciclina, minociclina, trimetoprim/sulfametossazolo e claritromicina. Nella pratica clinica viene solitamente impiegato un singolo farmaco poiché il rischio di acquisizione di resistenze è piuttosto basso. Tuttavia, anche la combinazione di rifampicina ed etambutolo è stata utilizzata con successo. Il test di sensibilità di *Mycobacterium marinum* va eseguito solo per pazienti le cui colture rimangono positive dopo diversi mesi di terapia.

Il metodo raccomandato è quello di microdiluzione in brodo, utilizzando brodo Mueller-Hinton con aggiunta di cationi e OADC (9.2.1.).

Sebbene gli isolati clinici richiedano una temperatura di incubazione di 28-30 °C per la crescita in coltura primaria, molti di essi si adattano bene a 37 °C ed è a tale temperatura che debbono essere saggiati. Solo in caso di scarsa crescita a 37 °C, è consigliabile ripetere il test alla temperatura più bassa. Il periodo di incubazione dovrebbe essere di 7 giorni. L'elenco dei farmaci, con relative concentrazioni, che è possibile testare per il test di sensibilità è riportato in tabella 4 (4).

Il risultato del test deve essere interpretato in base alle indicazioni della tabella 7.

9.2.5. TEST DI SENSIBILITÀ PER ALTRI MICOBATTERI NON TUBERCOLARI A LENTA CRESCITA

Altre specie di micobatteri a lenta crescita possono essere responsabili di patologie umane, come ad esempio *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium malmoense* e *Mycobacterium simiae*. Il metodo utilizzabile per il test di sensibilità di queste specie è quello di microdiluzione in brodo Mueller-

Hinton con aggiunta di cationi e OADC (9.2.1.). I farmaci eventualmente da testare e i relativi criteri di interpretazione sono analoghi a quelli suggeriti per *Mycobacterium kansasii* (tabella 6).

Tab. 7 - BREAKPOINT DI RESISTENZA PER IL TEST DI SENSIBILITÀ MEDIANTE MICRODILUIZIONE IN BRODO DI MYCOBACTERIUM MARINUM.

Farmaci	MIC (µg/mL) di resistenza
Amikacina	>32
Ciprofloxacina	>2
Claritromicina ^a	>16
Doxiciclina/minociclina	>4
Etambutolo	>4
Moxifloxacina	>2
Rifabutina	>2
Rifampicina	>1
Trimetoprim/sulfametossazolo	>2/38

^a La claritromicina è il rappresentante di classe dei nuovi macrolidi; riportare la MIC, senza interpretazione.

9.3. TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA

Le raccomandazioni riguardanti il test di sensibilità dei micobatteri a rapida crescita sono basate su studi che hanno interessato il gruppo del *Mycobacterium fortuitum* (*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium houstonense*, *Mycobacterium neworleansense*, *Mycobacterium boenickei* e *Mycobacterium brisbanense*), *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus*, ma possono essere applicate anche a *Mycobacterium mucogenicum*, al gruppo del *Mycobacterium smegmatis* (*Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium wolinskyi*) e ai micobatteri pigmentati a rapida crescita clinicamente significativi (26).

L'attuale standard di riferimento, la microdiluzione in brodo, richiede una certa esperienza nonché la conoscenza dei profili di sensibilità delle diverse specie (3, 4); ne consegue che gli isolati devono sempre essere identificati accuratamente (4). Si raccomanda ai microbiologi che isolano i suddetti micobatteri solo occasionalmente di inviarli per l'esecuzione del test di sensibilità a un Laboratorio di Riferimento o di valutare la performance del metodo usato comparandone i risultati con quelli ottenuti in un Centro di Riferimento. Per i farmaci da usare e i rispettivi range di concentrazione si veda la tabella 8.

Per la semplicità di esecuzione, il sistema E-test viene spesso utilizzato come alternativa alla microdiluzione in brodo per lo studio della sensibilità dei micobatteri a rapida crescita. Si tratta di un metodo quantitativo che utilizza una sottile striscia di plastica inerte e non porosa che presenta, su una faccia, una scala graduata di concentrazioni e, sull'altra, un farmaco, essiccato e stabilizzato, immobilizzato in un gradiente esponenziale predefinito. Le valutazioni di questo metodo non hanno evidenziato, per i micobatteri a rapida crescita, risultati sovrapponibili a quelli della microdiluzione in brodo; il suo utilizzo non è pertanto raccomandato (28, 29).

Tab. 8 - RANGE DI DILUIZIONE DEI DIVERSI FARMACI PER IL TEST DI SENSIBILITÀ DEI MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA.

Farmaci	Range di diluizione (µg/mL)
Trimetoprim/sulfametossazolo	0,25/4,75-8/152
Ciprofloxacina	0,125-4
Moxifloxacina	0,25-8
Cefoxitina	4-128
Amikacina	1-64
Doxiciclina	0,125-16
Tigeciclina	0,015-4
Claritromicina	0,06-16
Linezolid	1-32
Imipenem	2-64
Cefepime	1-32
Amoxicillina/ac. clavulanico	2/1-64/32
Ceftriaxone	4-64
Minociclina	1-8
Tobramicina	1-16

Indicazioni per l'esecuzione del test di sensibilità

Diversamente da quanto detto per i micobatteri non tubercolari a crescita lenta, il test di sensibilità deve essere eseguito su tutti i ceppi a rapida crescita isolati da sangue, biopsie e cute. In caso di isolamento dall'escreato occorre valutarne accuratamente la significatività clinica, escludendo che si tratti di contaminanti o colonizzanti. Importanti elementi a sostegno della rilevanza clinica sono:

- l'isolamento ripetuto da campioni multipli;
- l'isolamento da un campione con esame microscopico positivo;
- la crescita di un elevato numero di colonie su terreno solido.

Nel caso in cui la positività sia limitata a una di una serie di colture, è estremamente improbabile che l'isolato abbia significato clinico e non esiste indicazione all'esecuzione del test di sensibilità.

La mancata eradicazione di un micobatterio a rapida crescita da un sito corporeo diverso da quello respiratorio, dopo 6 mesi di appropriata terapia, richiede la conferma dell'identificazione a livello di specie e la ripetizione del test di sensibilità.

9.3.1. SAGGIO DI SENSIBILITÀ CON IL SISTEMA SENSITITRE

Principio:

Il metodo di microdiluizione in brodo *Sensititre* (TREK Diagnostic Systems) è commercialmente disponibile per il test di sensibilità dei micobatteri non tubercolari a rapida crescita ed è provvisto di marchio CE per uso diagnostico *in vitro*. Il sistema permette la determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) utilizzando piastre a 96 pozzetti contenenti diluizioni per raddoppio di vari antibiotici allo stato liofilo (tab. 8).

Reagenti:

- Pannello *Sensititre*;
- Standard di torbidità McFarland 0,5;
- Provetta con acqua demineralizzata e sfere di vetro;
- Brodo Mueller-Hinton con aggiunta di cationi e tampone TES (CAMHBT, *Sensititre*);
- Lettore a specchio.

Procedimento:

- prelevare con un'ansa 5-10 colonie dal terreno solido e trasferirle in una provetta sterile con tappo a vite contenente acqua distillata sterile e alcune palline di vetro; omogeneizzare al vortex per 15-20 secondi;
- lasciar sedimentare le particelle più grossolane per qualche minuto e trasferire parte del supernatante in una nuova provetta sterile con tappo a vite contenente acqua demineralizzata. Aggiustare la torbidità allo 0,5 dello standard McFarland. Può anche essere utilizzata, al posto della sospensione preparata da colonie, una coltura in brodo;
- trasferire 50 μL di sospensione nella provetta contenente brodo Mueller-Hinton. Si ottiene in tal modo un inoculo di 5×10^5 UFC/mL;
- invertire la provetta 8-10 volte. L'esecuzione dei passaggi suddetti deve essere completata entro 30 minuti;
- trasferire 100 μL in ciascun pozzetto entro 30 minuti. Il trasferimento può essere eseguito manualmente, con una micropipetta, o utilizzando l'Autoinoculatore/AIM (*Sensititre*);
- sigillare la piastra con pellicola adesiva, premendo bene per garantire un'adeguata tenuta, evitando altresì la formazione di pieghe;
- depositare su una piastra di agar cioccolato una goccia della sospensione utilizzata per l'inoculo, per controllarne la purezza;
- incubare la piastra *Sensititre* a 28-30 °C per 3 giorni;
- se dopo 3 giorni la crescita nel pozzetto di controllo non è ottimale reincubare per un massimo di altri 2 giorni;
- leggere per primo il pozzetto di controllo positivo. Il controllo di crescita serve anche come standard di torbidità per la lettura delle MIC *breakpoint* (4). Se il controllo non evidenzia crescita il risultato del saggio non è valido.

I risultati possono essere letti senza rimuovere la pellicola adesiva. La crescita appare come torbidità o come deposito di cellule sul fondo del pozzetto. La MIC corrisponde alla concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita visibile. Fanno eccezione le sulfonamidi, per le quali la MIC equivale alla concentrazione più bassa in grado di inibire l'80% della crescita presente nel pozzetto del controllo positivo.

L'interpretazione degli *endpoint* (tab. 9) può risultare difficile soprattutto perché i pozzetti negativi possono evidenziare un leggero precipitato correlato all'inoculo. Si consiglia di prendere familiarità con la lettura utilizzando dei ceppi per il controllo di qualità con MIC note.

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Interpretazione dei risultati:

- isolati di *Mycobacterium abscessus* con una MIC per amikacina ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ dovrebbero essere ristestati. Qualora tale risultato sia confermato, refertare la MIC aggiungendo un commento

Tab. 9 - CRITERI INTERPRETATIVI PER IL TEST DI SENSIBILITÀ MEDIANTE MICRODILUIZIONE IN BRODO DEI MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA.

Farmaci	Interpretazione delle MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	sensibile	intermedio	resistente
Amikacina	≤ 16	32	≥ 64
Cefoxitina	≤ 16	32-64	≥ 128
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Doxiciclina	≤ 1	2-4	≥ 8
Imipenem	≤ 4	8-16	≥ 32
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32
Meropenem	≤ 4	8-16	≥ 32
Moxifloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Trimetoprim/sulfametossazolo	$\leq 2/32$	–	$\geq 4/64$
Tobramicina	≤ 2	4	≥ 8

del tipo: “Il valore di MIC risulta più elevato rispetto a quanto atteso per questa specie; l’impiego terapeutico del farmaco è sconsigliato”;

- ciprofloxacina è il rappresentante della classe dei “vecchi” fluorochinoloni; è meno attiva di gatifloxacina e moxifloxacina;
- claritromicina è il rappresentante della classe dei “nuovi” macrolidi. Le infezioni polmonari causate da micobatteri a rapida crescita non dovrebbero essere trattate in monoterapia con claritromicina;
- per i micobatteri a rapida crescita non pigmentati risultati sensibili alla claritromicina la lettura dovrebbe essere ripetuta a 14 giorni per evidenziare un’eventuale resistenza inducibile;
- doxiciclina e minociclina possono essere utilizzate indifferentemente per il saggio della sensibilità;
- per imipenem il *breakpoint* proposto non è definitivo e proprio come “tentative breakpoint” dovrebbe essere refertato, in attesa di ulteriore letteratura a riguardo. Se la MIC risulta $>8 \mu\text{g/mL}$ per *Mycobacterium fortuitum group*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium mucogenicum*, il test di sensibilità dovrebbe essere ripetuto e letto tassativamente ai 3 giorni. Qualora tale risultato sia riconfermato, refertare la MIC aggiungendo un commento del tipo: “Il valore di MIC risulta più elevato rispetto a quanto atteso per questa specie; l’impiego terapeutico del farmaco è sconsigliato”.

La MIC di imipenem non è valida per meropenem ed ertapenem. L’attività di imipenem sui micobatteri a rapida crescita è superiore a quella di meropenem ed ertapenem;

- la tobramicina viene usata prevalentemente per il trattamento delle infezioni da *Mycobacterium chelonae*. Se la MIC della tobramicina risulta $>4 \mu\text{g/mL}$ il test di sensibilità dovrebbe essere ripetuto. Se tale risultato viene riconfermato refertare la MIC aggiungendo un commento del tipo: “Il valore di MIC risulta più elevato rispetto a quanto normalmente atteso per questa specie; l’impiego terapeutico del farmaco è sconsigliato”.

Controllo di qualità:

Il ceppo di riferimento ideale per il controllo di qualità del test di microdiluizione in brodo dovrebbe presentare MIC intermedie per tutti i farmaci. *Mycobacterium peregrinum* ATCC 700686, incubato per 3 giorni a 30 °C, presenta tali caratteristiche (tab. 10). In alternativa possono essere utilizzati ceppi di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 o di *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

I ceppi di controllo devono essere conservati a -70 °C in un terreno appropriato (brodo trip-tosio con 15% di glicerolo) per minimizzare il rischio di alterarne la sensibilità ai farmaci. Tali ceppi devono essere trapiantati in modo da ottenere colonie isolate, e le colture non devono essere utilizzate per più di una settimana.

Ogni nuovo lotto di piastre per microdiluizione dovrebbe essere saggiato con l'appropriato ceppo di controllo per determinare se le MIC ottenute rientrano nei range attesi. Almeno una piastra di ogni nuovo lotto dovrebbe essere incubata in termostato, inocolata con brodo sterile, per verificarne la sterilità del terreno.

Tab. 10 - RANGE DI ACCETTABILITÀ DELLE MIC DEI CEPPI DI CONTROLLO DEL TEST DI MICRODILUIZIONE IN BRODO PER MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA.

Farmaci	Range delle MIC (µg/mL)			
	<i>M. peregrinum</i> ATCC 700686	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ^a	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ^a
Trimetoprim/sulfametossazolo	≤0,25/4,8-2/38	≤0,5/9,5	8/152-32/608	≤0,5/9,5
Ciprofloxacina	≤0,125-0,5	0,12-0,5	0,25-1	0,25-2
Moxifloxacina	≤0,06-0,25	4-16	1-8	0,06-0,5
Cefoxitina	4-32	1-4	–	–
Amikacina	≤1-4	1-4	1-4	64-256
Doxiciclina	≤0,125-0,5	0,125-0,5	–	2-8
Claritromicina	≤0,06-0,5	0,12-0,5	–	–
Linezolid	1-8	1-4	–	1-4
Imipenem	2-16	0,015-0,06	1-4	0,5-2
Minociclina	0,12-0,5	0,06-0,5	–	1-4
Tobramicina	2-8	0,125-1	0,25-1	8-32

^a Alcuni dati non sono disponibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Canetti G., Froman S., Grosset J., Haudoroy P., Langerová M., Mahler H.T., Meissner G., Mitchison D.A., Sula L., *Mycobacteria: laboratory methods for testing drug susceptibility and resistance*, 1963, Bull WHO; 29:565-578.
2. Canetti G., Rist N., Grosset J., *Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions*, 1963, Rev Tuberc Pneumol; 27:217-272.
3. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*, 2009, 8th Ed., Wayne, Pa; M07-A8.
4. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes; approved standard*, 2nd Ed., Wayne, Pa; M24-A2, 2011.
5. Espasa M., Salvadó M., Vicente E., Tudó G., Alcaide F., Coll P., Martin-Casabona N., Torra M., Fontanals D., González-Martín J., *Evaluation of the VersaTREK system compared to the Bactec MGIT 960 system for first-line drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*, 2012, J Clin Microbiol; 50:488-491.
6. Fattorini L., Migliori G.B., Cassone A., Mustazzolu A., Piccaro G., Filippini P., Cirillo D.M., Borroni E. e l'Italian Multicentre Study on Resistance to Antituberculosis Drugs (SMIRA) Group, *Proficiency testing of first- and second-line anti-tuberculosis drugs in Italy*, 2012, Eur Respir J; 39:1263-1266.
7. Garrigo M., Aragon L.M., Alcaide F., Borrell S., Cardenosa E., Galan J.J., Gonzalez-Martin J., Martin-Casabona N., Moreno C., Salvado M., Coll P., *Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT Mycobacterium detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with BACTEC 460TB for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*, 2007, J Clin Microbiol; 45:1766-1770.
8. Griffith M.E., Bodily H.L., *Stability of antimicrobial drugs in susceptibility testing*, 1992, Antimicrob Agents Chemother; 36:2398-2402.
9. Heifets L.B., *Drug susceptibility testing*, 1996, Clin Lab Med; 16:641-656.
10. Johansen I.S., Larsen A.R., Sandven P., Petrini B., Soini H., Levina K., Sosnovskaja A., Skenders G., Hoffner S., *Drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to fluoroquinolones: first experience with a quality control panel in the Nordic-Baltic collaboration*, 2003, Int J Tuberc Lung Dis; 7:899-902.
11. Kent P.T., Kubica G.P., *Antituberculosis chemotherapy and drug susceptibility testing*, in: Kent P.T., Kubica G.P. Ed., *Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory*, 1985, US Department of Health and Human Services, Atlanta, Ga; 159-184.
12. Krüüner A., Yates M.D., Drobniowski F.A., *Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of Mycobacterium tuberculosis*, 2006, J Clin Microbiol; 44:811-818.
13. LaBombardi V.J., *Comparison of the ESP and BACTEC systems for testing susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis complex isolates to pyrazinamide*, 2002, J Clin Microbiol; 40:2238-2239.
14. Lee L.V., Della Latta P., *Susceptibility tests by modified agar proportion*. in: Isenberg HD. Ed., *Clinical microbiology procedure handbook*, 2004, ASM, Washington DC; 7.7.1-7.7.4.
15. Piersimoni C., Lacchini C., Penati V., Iona E., Fattorini L., Nista D., Zallocco D., Gesu G.P., Codecasa L., *Valida-*

- tion of the agar proportion and two liquid systems for testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to moxifloxacin, 2007, *Diagn Microbiol Infect Dis*; 57:283-287.
16. Piersimoni C., Olivieri A., Benacchio L., Scarparo C., *Current perspectives on drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex: the automated nonradiometric systems*, 2006, *J Clin Microbiol*; 44:20-28.
 17. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M., Chadwick M., Siddiqi S., *Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis to classical second-line drugs and newer antimicrobials*, 2006, *J Clin Microbiol*; 44:688-692.
 18. Salfinger M., Heifets L.B., *Determination of pyrazinamide MICs for Mycobacterium tuberculosis at different pHs by the radiometric method*, 1988, *Antimicrob Agents Chemother*; 32:1002-1004.
 19. Sanders C.A., Nieda R.R., Desmond E.P., *Validation of the use of Middlebrook 7H10 Agar, BACTEC MGIT 960, and BACTEC 460 12B media for testing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to levofloxacin*, 2004, *J Clin Microbiol*; 42:5225-5228.
 20. Scarparo C., Ricordi P., Ruggiero G., Piccoli P., *Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB Method*, 2004, *J Clin Microbiol*; 42:1109-1114.
 21. Sharma M., Thibert L., Chedore P., Shandro C., Jamieson F., Tyrrell G., Christianson S., Soualhine H., Wolfe J., *Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:4112-4116.
 22. Springer B., Lucke K., Calligaris-Maibach R., Ritter C., Böttger E.C., *Quantitative drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation*, 2009, *J Clin Microbiol*; 47:1773-1780.
 23. Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburgh C.R., Good R.C., *The resurgence of tuberculosis. Is your laboratory ready?*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:767-770.
 24. WHO, *Guideline for surveillance of drug resistance in tuberculosis*. 4th Ed., 2009, WHO/HTM/TB, Geneva.
 25. WHO, *Guidelines for drug susceptibility testing for second-line antituberculosis drugs for DOTS-plus*, 2001, WHO, Geneva.
 26. Wallace R.J. Jr., Glassroth J., Griffith D.E., Olivier K.N., Cook J.L., Gordin F., *Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria*, 1997, *Am J Respir Crit Care Med*; 156:S1-S25.
 27. Wang J.Y., Lee L.N., Lai H.C., Wang S.K., Jan I.S., Yu C.J., Hsueh P.R., Yang P.C., *Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure*, 2007, *J Antimicrob Chemother*; 59:860-865.
 28. Woods G.L., Bergman J.S., Witebsky F.G., Fahale G.A., Boulet B., Plaunt M., Brown B.A., Wallace R.J. Jr., Wanger A., *Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae and Mycobacterium fortuitum*, 2000, *J Clin Microbiol*; 38:656-661.
 29. Woods G.L., Warren N.G., Inderlied C.B., *Susceptibility test methods: mycobacteria, nocardia and other actinomycetes*, in: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A. Ed., *Manual of clinical microbiology*, 9th edition, 2007, ASM press, Washington DC; 1223-1247.

Capitolo 10

DETERMINAZIONE MOLECOLARE DELLA FARMACO-RESISTENZA

**Daniela Maria Cirillo,
Paolo Miotto,
Andrea Maurizio Cabibbe**

10. DETERMINAZIONE MOLECOLARE DELLA FARMACO-RESISTENZA

Il numero dei farmaci antitubercolari al momento disponibili è limitato a causa della resistenza intrinseca dei micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex alla maggior parte degli antibiotici noti. Tale resistenza è dovuta a peculiari caratteristiche morfologiche e strutturali; la parete cellulare, spessa e altamente idrofobica, e la presenza di β -lattamasi e di sistemi di espulsione attiva sono tra i principali fattori coinvolti (16).

La determinazione corretta dei profili di sensibilità ai farmaci è cruciale per poter intraprendere un trattamento appropriato, che ha come conseguenza la diminuzione della contagiosità del paziente, la protezione della comunità e la riduzione della mortalità per malattia (10). Pertanto è di fondamentale importanza ottenere rapidamente il profilo di farmaco-resistenza del primo ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* isolato da ogni nuovo paziente sia per poter iniziare una terapia adeguata, sia per prevenire la diffusione di ceppi resistenti nella popolazione.

La scarsa aderenza alla terapia da parte del paziente oppure l'impiego di terapie a base di un singolo farmaco, a seguito di prescrizioni errate, favoriscono lo sviluppo della farmaco-resistenza (20, 75). Recentemente si è ipotizzato che anche la variabilità individuale relativa a parametri quali la farmacocinetica abbia un ruolo significativo nell'insorgenza di farmaco-resistenza durante il trattamento antitubercolare (63).

L'antibiogramma ottenibile con i metodi basati sulla crescita in coltura del microrganismo è condizionato dai tempi lunghi necessari, tanto che di norma è raramente disponibile entro quattro settimane dall'arrivo del campione in laboratorio. Con l'aumento dei ceppi multiresistenti (MDR, *multidrug resistance*, definita come resistenza ad almeno rifampicina e isoniazide) e con l'insorgenza di multiresistenze allargate ai farmaci di seconda scelta (XDR, *extensive drug resistance*), ogni ritardo nella diagnosi di farmaco-resistenza compromette l'esito della terapia, in particolare nei soggetti a rischio per forme tubercolari disseminate, quali gli immunodepressi, in particolare se coinfecti con il virus HIV (22, 43).

I recenti progressi nella comprensione delle basi molecolari implicate nella farmaco-resistenza e la possibilità di rilevare il DNA dei bacilli tubercolari direttamente a livello dei campioni clinici rendono l'identificazione molecolare delle mutazioni associate alla farmaco-resistenza un mezzo utile per la determinazione della sensibilità ai farmaci in tempi rapidi (da poche ore a pochi giorni) (52).

10.1. BASI MOLECOLARI DELLA FARMACO-RESISTENZA IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Nel bacillo tubercolare le resistenze insorgono attraverso mutazioni cromosomiche (1). Solo raramente l'inserzione di elementi genici mobili (quali l'*IS6110*) contribuisce all'insorgenza della resistenza attraverso l'inattivazione di geni critici per il meccanismo d'azione del farmaco (36). Nella tabella I sono riportati i principali geni implicati nella resistenza di *Mycobacterium tuberculosis* ad alcuni dei farmaci antitubercolari di maggior rilevanza dal punto di vista clinico: mentre per la rifampicina le principali mutazioni responsabili di resistenza sono circoscritte a un singolo gene, la subunità β della RNA-polimerasi (*rpoB*), per gli altri farmaci sono state descritte mutazioni a carico di più geni.

Tab. I - PRINCIPALI MUTAZIONI CHE CONFERISCONO RESISTENZA IN *M. TUBERCULOSIS* (1, 75).

Farmaco	Geni con mutazioni conferenti resistenza
Isoniazide	<i>katG, inhA, oxyR, ahpC, ndh</i>
Rifampicina	<i>rpoB</i>
Pirazinamide	<i>pncA</i> , inserzioni di IS6110
Etambutolo	<i>embB, embC</i>
Streptomicina	<i>rpsL, rrs, gidB</i>
Amikacina, kanamicina, viomicina	<i>rrs, eis, gidB</i>
Capreomicina	<i>rrs, tlyA</i>
Fluoroquinoloni	<i>gyrA, gyrB</i>
Etionamide	<i>ethA, inhA</i>

10.1.1. RIFAMPICINA, ISONIAZIDE ED ETIONAMIDE

La rifampicina è l'antibiotico ideale per la valutazione molecolare della resistenza. Infatti, oltre il 95% delle mutazioni a cui è associato il fenotipo resistente è circoscritto a una regione di sole 81 pb del gene *rpoB* (55) (fig. 10.1). L'80-95% (la percentuale varia nei diversi Paesi) dei ceppi rifampicino-resistenti è anche isoniazide-resistente (14, 23, 65); per questo motivo la resistenza alla rifampicina è spesso considerata un marcatore per i ceppi MDR. Secondo le recenti raccomandazioni dell'OMS, i ceppi in cui la resistenza alla rifampicina è identificata con test molecolari che non sono in grado di fornire indicazioni sulla resistenza all'isoniazide (Xpert MTB/Rif, vedi capitolo 11) devono essere classificati come rifampicino-resistenti e non come MDR. Nelle regioni geografiche in cui la rifampicino-resistenza isolata è frequente, è consigliato il mantenimento dell'isoniazide nel regime terapeutico fino alla definizione del profilo di sensibilità con altre metodiche.

Le tecniche che utilizzano l'amplificazione del DNA per rilevare la rifampicino-resistenza rappresentano, dunque, strumenti di utilità clinica rilevante, con un buon rapporto costo-efficacia, se utilizzate in gruppi di pazienti per i quali esista un rischio consistente di una forma tubercolare MDR (pazienti provenienti da Paesi con MDR superiore al 10% nei nuovi casi, ritrattamenti, contatti di pazienti MDR, pazienti che hanno interrotto o eseguito in modo discontinuo il trattamento anti-tubercolare). Esse permettono, infatti, di identificare precocemente quei pazienti che non possono trarre giovamento da una terapia standard – che può anzi portare allo sviluppo di nuove resistenze – e che richiedono, invece, un trattamento di associazione con farmaci di seconda scelta.

La resistenza all'isoniazide è multifattoriale: circa il 60-80% delle mutazioni interessa il codone 315 del gene codificante per la catalasi-perossidasi (*katG*), ma mutazioni responsabili di farmaco-resistenza sono state individuate anche nei geni *inhA* (10-20%), *ahpC*, *oxyR*, *ndh*, *furA* e *kasA* (2, 3, 13, 30, 35, 59, 61). Anche i sistemi coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio ossido-riduttivo cellulare sono implicati nel meccanismo di azione di questo farmaco (69, 71).

L'etionamide è un farmaco di seconda linea che può essere considerato una valida alternativa all'isoniazide in caso di tubercolosi MDR: è infatti un analogo strutturale dell'isoniazide e ne condivide il target, l'enoil-ACP reductasi codificata dal gene *inhA*. Di conseguenza, sono stati osservati

casi di cross-resistenza tra i due farmaci in presenza di mutazioni in *inhA*. Isoniazide ed etionamide, pur essendo entrambi profarmaci, presentano meccanismi di attivazione diversi; la prima è attivata da una catalasi-perossidasi (KatG) e la seconda da una monoossigenasi (EthA) sotto il controllo del repressore *ethR*: mutazioni in *katG* e in *ethA/ethR* portano, rispettivamente, a resistenza alla sola isoniazide e alla sola etionamide. È questo il razionale dell'utilizzo clinico dell'etionamide nei casi di isoniazide-resistenza (8). Mutazioni in *ethA* sono state osservate nel 50% dei casi di resistenza all'etionamide, ma la percentuale varia molto da studio a studio (6, 8, 17, 49, 70).

Altri geni implicati nell'insorgenza di farmaco-resistenza potrebbero essere *ndh*, *mshA* e *dfrA* (8).

La figura 10.2 riassume il meccanismo di azione di isoniazide ed etionamide ed evidenzia i principali geni coinvolti nell'insorgenza di resistenze fenotipiche.

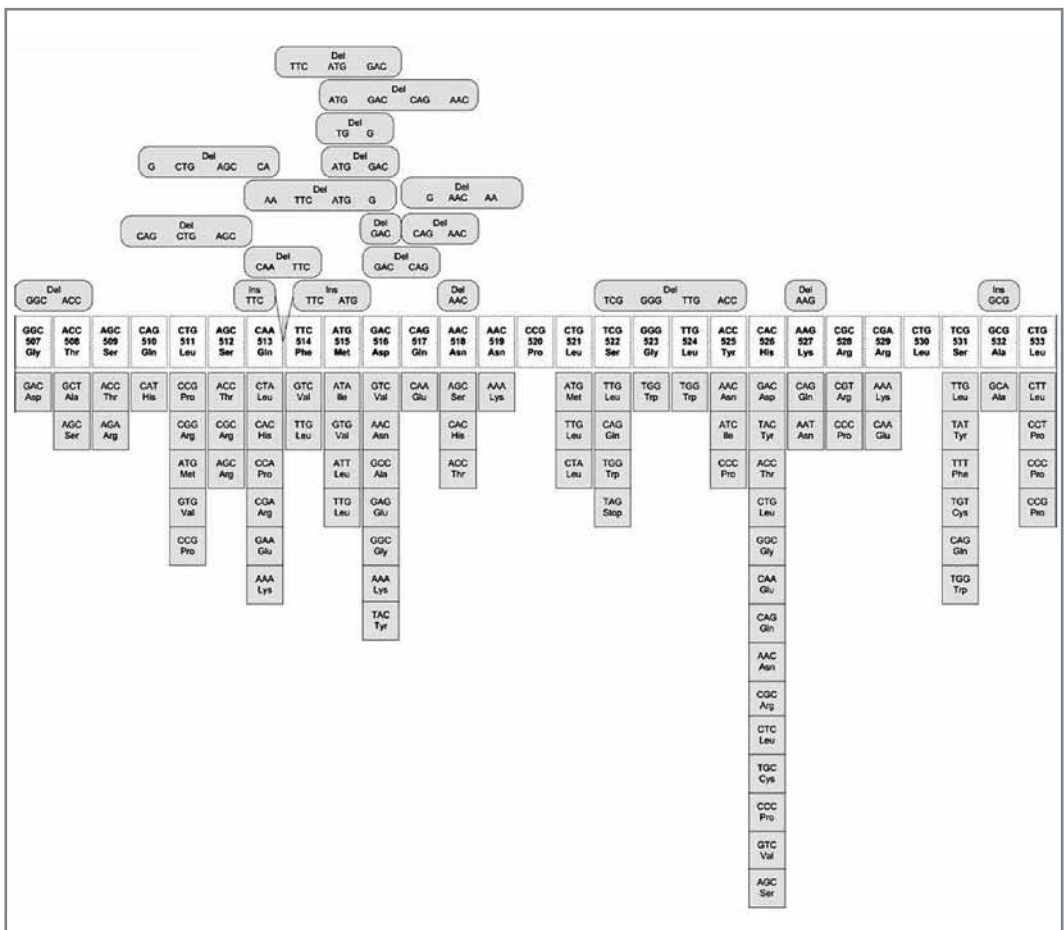


Fig. 10.1 - REGIONE *HOT-SPOT* DEL GENE *RPOB* CON LE MUTAZIONI PIÙ FREQUENTI RISCOSE IN ISOLATI CLINICI RIFAMPICINO-RESISTENTI.

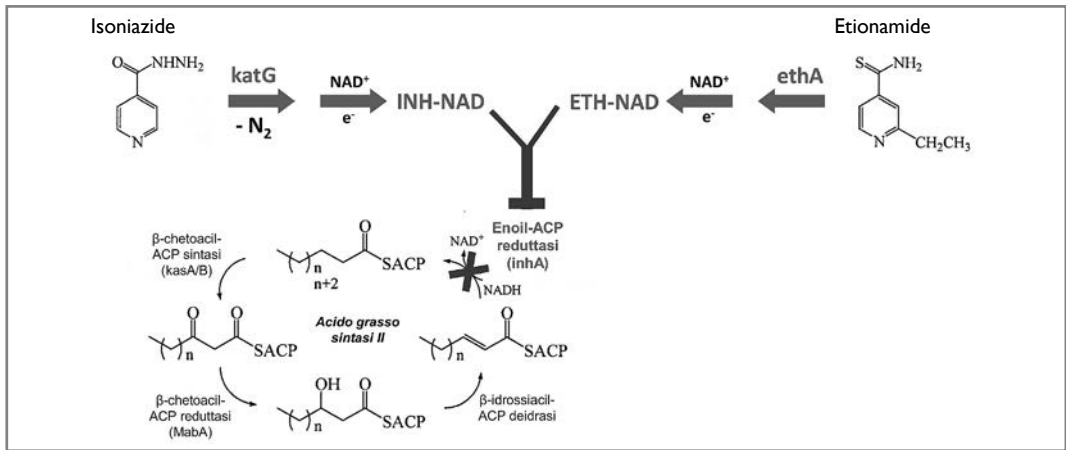


Fig. 10.2 - MECCANISMO DI AZIONE DI ISONIAZIDE ED ETIONAMIDE E PRINCIPALI GENI COINVOLTI NELL'INSORGENZA DI FARMACO-RESISTENZA (DA 69, MODIFICATO).

10.1.2. ETAMBUTOLO E PIRAZINAMIDE

L'analisi di sequenza ha portato a identificare una regione determinante per la resistenza all'etambutolo nel gene *embB*; la mutazione piú rilevante consiste in una sostituzione di una base nel codone 306 (70% dei casi circa). La modesta concordanza tra l'identificazione della mutazione e la resistenza al test fenotipico (in terreno liquido MGIT 960) potrebbe essere correlata alla performance subottimale di quest'ultimo: alcuni Autori hanno infatti dimostrato che, in presenza della mutazione 306, la concentrazione minima inibente è sensibilmente aumentata (44, 54). Le mutazioni Met306Val e Met306Leu sono associate a resistenza fenotipica; mutazioni in altri codoni di *embB* come Glu378Ala possono essere considerate invece marcatori filogenetici che non contribuiscono alla comparsa del fenotipo resistente (11). Sono state descritte anche mutazioni nel gene *embC* che sono tuttavia meno comuni negli isolati clinici (62).

L'attività battericida della pirazinamide è subordinata all'attivazione di tale farmaco da parte dell'enzima pirazinamidasi, posseduto da vari micobatteri fra cui *Mycobacterium tuberculosis*. La resistenza alla pirazinamide è determinata dal deficit dell'attività pirazinamidasi conseguente alla comparsa di mutazioni nel gene *pncA* che codifica per la pirazinamidasi (1, 75). Il 72-97% dei ceppi pirazinamide-resistenti presentano mutazioni *missense* in *pncA* (75) o nella regione regolatoria.

Poiché le mutazioni finora descritte sono numerose, l'unico approccio molecolare attualmente possibile è l'analisi di sequenza del gene *pncA*. Non tutte le mutazioni identificate sono tuttavia associate a un deficit funzionale della pirazinamidasi. Sono stati descritti casi di resistenza alla pirazinamide associati all'inserimento della sequenza d'inserzione IS6110 all'interno del gene *pncA* (23).

Recentemente, uno studio americano (57) ha proposto, per la pirazinamide, un nuovo meccanismo d'azione, a livello del processo di trans-traduzione che costituisce un passaggio chiave nella risposta allo stress di *Mycobacterium tuberculosis*. Tale studio dimostra come il farmaco sia in grado, legandosi direttamente alla proteina ribosomale S1, codificata dal gene *rpsA*, di inibire appunto la trans-traduzione e, in ultima analisi, di minare la capacità di reazione agli stress del micobatterio.

Questo spiegherebbe anche perché la pirazinamide sia particolarmente attiva ed efficace a pH acido, cioè nella condizione di stress in cui viene a trovarsi *Mycobacterium tuberculosis* durante l'infezione. Lo studio evidenzia inoltre come mutazioni nel gene *rpsA* siano associate a resistenza fenotipica alla pirazinamide. Ulteriori indagini sono tuttavia necessarie per comprendere meglio il ruolo di *rpsA* nell'insorgenza di farmaco-resistenza alla pirazinamide negli isolati clinici.

La figura 10.3 riassume i principali meccanismi di resistenza per la pirazinamide.

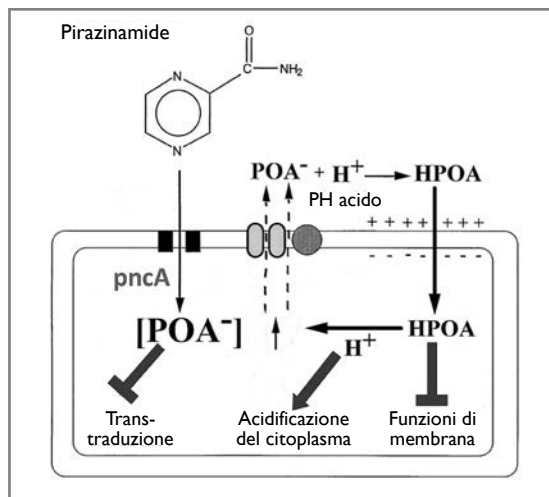


Fig. 10.3 - MECCANISMO DI AZIONE DELLA PIRAZINAMIDE E PRINCIPALI GENI COINVOLTI NELL'INSORGENZA DI FARMACO-RESISTENZA (DA 74, MODIFICATO).

10.1.3. AMINOGLICOSIDI E PEPTIDI CICLICI

La streptomina interferisce sulla sintesi proteica. Per la resistenza alla streptomina sono state identificate varie mutazioni specifiche, la più frequente delle quali interessa il codone 43 del gene *rpsL*; essa è presente tuttavia solo nel 54% dei ceppi resistenti. L'8% dei ceppi resistenti è mutato in due regioni ristrette del gene *rrs*.

Dato che anche altri aminoglicosidi (kanamicina e amikacina) e i peptidi ciclici (capreomicina e viomicina) hanno come bersaglio la sintesi proteica, mutazioni che colpiscono le stesse regioni geniche possono conferire resistenza a diversi farmaci. *Mycobacterium tuberculosis* sviluppa resistenza ad antibiotici quali amikacina, kanamicina e capreomicina mediante acquisizione di mutazioni nucleotidiche nel gene *rrs*; tali mutazioni sono presenti nel 70-80% dei ceppi resistenti (21). In particolare, la transizione A→G alla posizione 1401 è associata a resistenze ad alto livello a kanamicina e amikacina nel 60-100% dei ceppi (11, 21). Il gene *rrs* è implicato anche nella resistenza ai peptidi ciclici capreomicina e viomicina (1, 21, 75). Il meccanismo di azione dei farmaci iniettabili di seconda linea è riassunto in figura 10.4.

Anche il gene *tlyA*, che codifica per una metiltransferasi che metila gli rRNA 16S e 23S, conferisce, se mutato, resistenza ai peptidi ciclici (1, 75). Mutazioni in *tlyA* sono responsabili della mancata metilazione degli rRNA in corrispondenza dei siti di legame di capreomicina e viomicina e conseguentemente dello sviluppo di resistenza (28). La frequenza di mutazioni nel gene *tlyA* in isolati clinici resistenti a capreomicina e/o viomicina sembra però non essere molto significativa, attestandosi tra l'1% e il 3% (21).

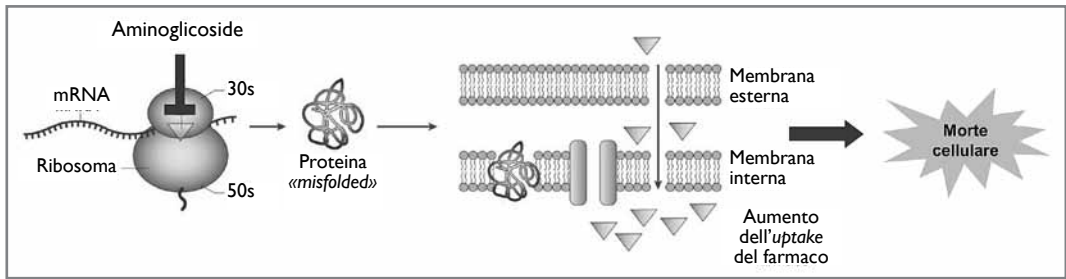


Fig. 10.4 - MECCANISMO DI AZIONE DEI FARMACI DI SECONDA LINEA INIETTABILI (DA 32, MODIFICATO).

Recentemente è stato osservato che anche mutazioni che colpiscono i geni *gidB* ed *eis* sembrano coinvolte nell'insorgenza di resistenza agli aminoglicosidi. Il gene *gidB* codifica per una 7-metilguanosina metiltransferasi, specifica per l'rRNA 16S e conservata tra i batteri. È stato dimostrato che mutazioni in questo gene, rendendo impossibile la metilazione dell'rRNA 16S, causano resistenza alla streptomicina in diversi batteri, tra i quali *Mycobacterium tuberculosis* (51). Mutazioni in questo gene sono state associate inoltre a resistenza a kanamicina e amikacina anche in isolati clinici (21). Il gene *eis*, invece, oltre a giocare un ruolo importante nella sopravvivenza di *Mycobacterium tuberculosis* all'interno dei macrofagi (51), sembra, in base ad analisi bioinformatiche, codificare per una acetiltransferasi della famiglia GNAT (N-acetiltransferasi GCN5-correlate). Le funzioni delle proteine appartenenti a questa superfamiglia sono molto diverse e includono, tra quelle più importanti, modificazione di alcuni antibiotici, con conseguente farmaco-resistenza (AG N-acetiltransferasi), e regolazione della trascrizione (istone-acetiltransferasi) (68). Solo recentemente sono state individuate mutazioni nella regione del promotore di *eis* che sembrano conferire resistenza a bassi livelli alla kanamicina in *Mycobacterium tuberculosis* (73, 12). I primi studi su isolati clinici confermano un importante ruolo di tali mutazioni nell'insorgenza di farmaco-resistenza a kanamicina (20-30%) (21). La possibilità che mutazioni nel promotore di *eis* conferiscano cross-resistenza a kanamicina e amikacina rimane da valutare.

10.1.4. FLUOROCHINOLONI

Come per altri farmaci, anche per i fluorochinoloni si osserva una rapida insorgenza di resistenza quando questi vengono utilizzati in monoterapia o in associazione a un solo altro farmaco verso cui il ceppo sia resistente (24). Il principale meccanismo di resistenza è attribuibile a mutazioni nel gene *gyrA* che codifica per la subunità A della DNA girasi, una topoisomerasi di tipo II (fig. 10.5). Tali mutazioni impediscono il legame del farmaco all'enzima che ne costituisce il target (53). Le principali mutazioni associate a resistenza interessano una regione ristretta di circa 120 pb e sono presenti nel 70-90% dei ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti a tale farmaco (1, 75). Tali mutazioni colpiscono soprattutto il codone 94 (Asp94Gly, Asp94Ala, Asp94Asn, Asp94Tyr) e il codone 90 (Ala90Val). Sostituzioni al codone 80 (Thr80Ala) potrebbero essere associate a bassi livelli di resistenza. In un numero limitato di casi si trovano mutazioni anche nel gene *gyrB* che codifica per la subunità B dell'enzima (64).

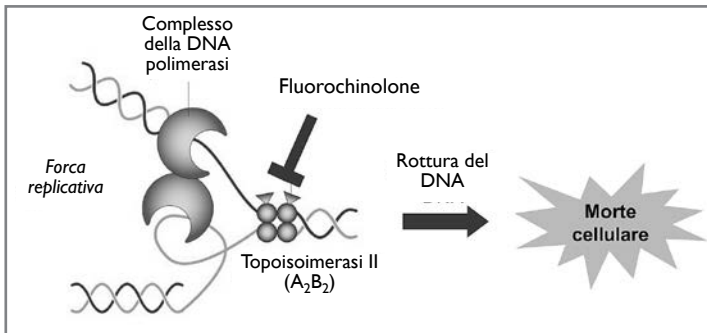


Fig. 10.5 - MECCANISMO DI AZIONE DEI FLUOROCHINOLONI (DA 32, MODIFICATO).

10.1.5. ALTRI MECCANISMI DI FARMACO-RESISTENZA

Tra le altre cause di farmaco-resistenza sembrano rivestire un ruolo particolarmente importante i meccanismi di trasporto e la permeabilità di parete (18, 37, 40). Alterazioni nei meccanismi di *uptake* possono indurre resistenza alla pirazinamide in assenza di mutazioni nel gene che codifica per la pirazinamidasi (74). Un possibile meccanismo di resistenza ai fluorochinoloni sarebbe dovuto alla proteina MfpA, codificata del gene *mfpA*, capace di competere con il farmaco per il sito di legame sulla DNA girasi (25, 42). I meccanismi di resistenza legati al trasporto dei farmaci e alla permeabilità di parete richiedono indagini più complesse e l'identificazione di mutazioni ad essi legate risulta critica.

10.1.6. RESISTENZE CROCIATE

La cross-resistenza è molto comune tra farmaci di uno stesso gruppo che condividono lo stesso bersaglio molecolare, quali ad esempio i fluorochinoloni. Il caso di isoniazide-etionamide è stato precedentemente discusso; nell'ambito degli aminoglicosidi, si osserva cross-resistenza completa tra amikacina e kanamicina, mentre la maggior parte dei ceppi streptomicina-resistenti sono sensibili a questi due farmaci (4). Sebbene vi siano alcuni studi in proposito (41), la correlazione tra mutazioni geniche e cross-resistenza tra aminoglicosidi e peptidi ciclici rimane tuttora da chiarire (21, 27, 44).

Per quanto riguarda la classe delle rifamicine, le mutazioni ai codoni 526 e 531 del gene *rpoB* conferiscono alti livelli di resistenza a rifampicina, rifabutina e rifapentina (5), mentre le mutazioni ai codoni 516 e 522 conferiscono rifampicino-resistenza non associata, nel 90% dei casi, a resistenza alla rifabutina (58).

10.2. IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DEL PROFILO DI RESISTENZA DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

La difficoltà tecnica di individuare mutazioni disperse su uno o più geni e le lacune nella conoscenza di tutti i meccanismi molecolari di farmaco-resistenza non permettono, per ora, alle metodiche genetiche di individuare tutte le possibili resistenze. L'esecuzione dell'antibiogramma colturale rimane pertanto imprescindibile. Le tecniche molecolari hanno però il vantaggio di essere molto più rapide rispetto ai metodi tradizionali e si rivelano particolarmente utili in caso di sospetta

tubercolosi MDR. Per questo motivo, l'OMS ha approvato l'utilizzo di test molecolari per l'identificazione rapida della tubercolosi MDR (39). La sensibilità delle varie metodiche molecolari dipende dalla frequenza, nelle diverse aree geografiche, delle singole mutazioni responsabili di resistenza e, nel caso il test venga eseguito direttamente sul campione, dalla quantità di DNA di *Mycobacterium tuberculosis* presente.

I progressi nella comprensione dell'epidemiologia di *Mycobacterium tuberculosis* hanno evidenziato come la distribuzione filo-geografica del batterio possa influire sui valori predittivi positivo e negativo di un test molecolare per l'identificazione di farmaco-resistenza (15, 19), dal momento che la frequenza di mutazioni specifiche associate al fenotipo esistente può variare da regione a regione.

L'analisi applicata al DNA estratto da isolati di *Mycobacterium tuberculosis* fornisce risultati soddisfacenti, ma è dipendente dai tempi, relativamente lunghi, dell'esame colturale. La sensibilità del test impiegato direttamente su campioni clinici, sia respiratori che extrapulmonari, è comparabile a quella relativa ai ceppi isolati soltanto quando i campioni sono positivi all'esame microscopico. Nei campioni microscopico-negativi la sensibilità è invece insufficiente, probabilmente a causa della resa subottimale del processo di estrazione del DNA dai micobatteri. L'esecuzione del test a fini diagnostici è raccomandata dall'OMS solo per i laboratori che utilizzano lo strumento Xpert MTB/Rif (vedi capitolo 11) (50, 72).

Il sequenziamento delle regioni interessate da mutazioni rappresenta certamente la metodica di riferimento; ad esso si sono affiancate tecniche che utilizzano la PCR associata a particolari sonde molecolari in grado di legarsi a bersagli specifici (29, 50, 72). Queste metodiche hanno fornito risultati eccellenti sia in termini di rapidità (poche ore) sia in termini di accuratezza diagnostica. Tuttavia, l'impiego in routine di metodiche molecolari per l'identificazione rapida di farmaco-resistenze in *Mycobacterium tuberculosis* non può prescindere da un'accurata analisi di costo-efficacia (47, 60).

10.2.1. LA TECNOLOGIA LINE PROBE ASSAY

La tecnologia *Line Probe Assay* (LiPA) ha notevolmente semplificato l'esecuzione dei test molecolari per la determinazione di farmaco-resistenza. I test LiPA si basano sull'ibridazione inversa di amplificati, prodotti in una PCR *multiplex*, con sonde legate a un supporto di nitrocellulosa. Tali sonde coprono sequenze, parzialmente sovrappoventisi, della regione d'interesse, sia prive di mutazioni (*wild-type*) che specifiche per le mutazioni più comuni. L'amplificazione viene eseguita utilizzando *primer* biotinilati. Dopo denaturazione, gli amplificati, a singolo filamento e marcati con biotina, vengono fatti ibridare alle sonde legate al supporto, mediante incubazione in condizioni di elevata stringenza. L'ibridazione viene rilevata mediante l'aggiunta di fosfatasi alcalina coniugata a streptavidina e, successivamente, del substrato per la fosfatasi alcalina. La presenza di mutazioni è indicata dall'assenza di ibridazione di una o più sonde *wild-type* ed eventualmente dalla presenza di ibridazione di una o più sonde mutate.

10.2.2. I TEST COMMERCIALI

10.2.2.1. INNO-LIPA Rif.TB

Principio:

Il test INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics) utilizza la tecnologia LiPA per identificare le mutazioni più frequenti nella regione *hot-spot* di *rpoB*, responsabili di resistenza alla rifampicina. La procedura

è suddivisa in tre fasi successive: estrazione del DNA, amplificazione *multiplex* e ibridazione con sonde oligonucleotidiche sovrappontenti, fissate su un supporto solido. Tali sonde sono complementari a 9 regioni geniche: 5 segmenti *wild type* (*rpoB* S1, *rpoB* S2, *rpoB* S3, *rpoB* S4, *rpoB* S5) e 4 segmenti mutati (R2, R4a, R4b, R5) della regione *hot-spot* del gene *rpoB*. È presente inoltre una sonda specifica per *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Per effettuare il test direttamente su campione clinico, la procedura prevede l'impiego di un protocollo di amplificazione *nested* e l'utilizzo di *primer* esterni non inclusi nel kit base, ma richiedibili separatamente. L'ibridazione e la rilevazione delle *strip* possono essere automatizzate.

Procedura e reagenti:

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Caratteristiche del test:

Sui ceppi isolati da coltura il test è caratterizzato da una sensibilità del 95-100% e da una specificità del 100% (48). Nei campioni clinici la specificità rimane del 100%, mentre si riscontra una riduzione della sensibilità (48, 66). Il test è da considerarsi non valido qualora manchi l'ibridazione con la sonda specifica per *Mycobacterium tuberculosis* complex.

10.2.2.2. GENOTYPE MTBDRplus

Principio:

Il test commerciale GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience) utilizza, analogamente al kit INNO-LiPA, la tecnologia d'ibridazione inversa per identificare le mutazioni più frequenti nelle regioni di *rpoB*, *katG* e *inhA* conferenti rispettivamente rifampicino- (*rpoB*) e isoniazide-resistenza (*katG* e *inhA*).

La procedura è suddivisa in tre fasi successive: estrazione del DNA, amplificazione *multiplex* e ibridazione con sonde oligonucleotidiche sovrappontenti, fissate su un supporto solido. La PCR *multiplex* produce amplificati delle dimensioni di 63 pb (controllo di amplificazione), 115 pb (controllo *Mycobacterium tuberculosis* complex-specifico), 166 pb (frammento di *rpoB*), 120 pb (frammento di *katG*) e 110 pb (frammento di *inhA*). Le sonde specifiche per regioni conservate dei loci *rpoB*, *katG* e *inhA* hanno la funzione di confermare l'avvenuta amplificazione dei geni in questione.

Sono inoltre presenti:

- un controllo universale (UC), costituito da una sonda che riconosce gli amplificati derivati da batteri Gram-positivi ad alto contenuto di guanina-citosina, fra i quali sono compresi i micobatteri;
- un controllo (TUB), che ha come bersaglio una sequenza, all'interno dell'rRNA 23S, specifica del *Mycobacterium tuberculosis* complex.

La rifampicino- e l'isoniazide-resistenza sono indicate dall'assenza di ibridazione con una o più sonde *wild-type* ed eventualmente dalla presenza di ibridazione delle corrispondenti sonde mutate.

Il test è da considerarsi non valido qualora manchi l'ibridazione con una o più sonde di controllo: universale e specifiche per *Mycobacterium tuberculosis* complex e per i loci *rpoB*, *katG* e *inhA*.

Procedura e reagenti:

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Caratteristiche del test:

La sensibilità e la specificità del test eseguito sia su ceppi isolati in coltura, sia su campioni

clinici, respiratori e non, sono state valutate in diversi lavori scientifici pubblicati (26, 34, 45). In particolare, metanalisi e studi multicentrici riportano sensibilità e specificità superiori al 98% per la resistenza alla rifampicina. L'identificazione di farmaco-resistenza all'isoniazide mostra invece una sensibilità dell'80-90%, con una specificità del 99% (38). La sensibilità ancora subottimale del test nell'identificare l'isoniazide-resistenza è dovuta alla presenza di sonde in grado di evidenziare mutazioni soltanto in due regioni geniche: il codone 315 di *katG* e la regione a monte di *inhA*. Il saggio molecolare mostra pressoché gli stessi livelli di sensibilità e specificità quando utilizzato su campioni clinici respiratori positivi all'esame microscopico per bacilli alcol-acido-resistenti (46). I risultati sono disponibili in giornata; l'ibridizzazione e lo sviluppo delle *strip* possono essere automatizzati. È oggi disponibile anche un lettore automatico utilizzabile in associazione all'ibridizzatore automatico.

Da gennaio 2012 è commercialmente disponibile la nuova versione del kit, MTBDR_{plus} (v.2), che sembra avere una maggior sensibilità sui campioni microscopico-negativi. La nuova versione del test ha migliorato il pattern di ibridizzazione e le bande risultano meglio definite e più facilmente interpretabili; l'enzima fornito con il kit è stabile a temperatura ambiente. La figura 10.6 mostra la posizione delle sonde mutate e *wild-type* nel frammento del gene *rpoB* amplificato.

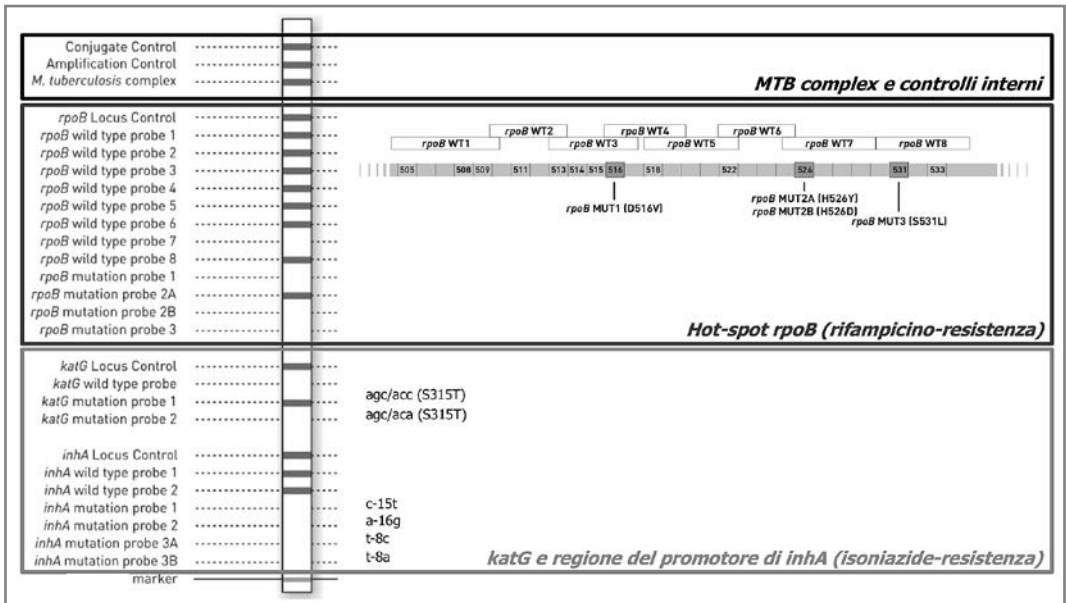


Fig. 10.6 - SONDE DEL SISTEMA GENOTYPE MTBDR_{PLUS} V. 2. POSIZIONE DELLE SONDE SULLA STRISCIA E RELATIVE REGIONI D'IBRIDIZZAZIONE NEI GENI *rpoB*, *katG* E *inhA* PER L'IDENTIFICAZIONE DI RIFAMPICINO- E ISONIAZIDE-RESISTENZA.

10.2.2.3. GENOTYPE MTBDR_{SL}

Principio:

Il test Genotype MTBDR_{SL} (Hain) si basa sulla tecnologia d'ibridizzazione inversa e permette l'identificazione genetica molecolare di *Mycobacterium tuberculosis* complex e la sua resistenza ai

farmaci chiave impiegati nel trattamento delle forme di tubercolosi MDR, quali fluorochinoloni (es. ofloxacina e moxifloxacina) e/o aminoglicosidi/peptidi ciclici (antibiotici iniettabili come kanamicina, amikacina, capreomicina, viomicina) e la resistenza all'etambutolo, partendo da campioni colturali o da campioni polmonari con microscopia positiva.

La resistenza ai fluorochinoloni viene identificata tramite la rilevazione delle mutazioni più significative del gene *gyrA* (codoni 85-97). Per la resistenza agli aminoglicosidi/peptidi ciclici viene analizzato il gene *rrs* (nucleotidi 1401, 1402, 1484) e la resistenza all'etambutolo è valutata tramite l'identificazione di mutazioni al codone 306 del gene *embB*.

Per ogni regione genica in esame sono presenti sonde di controllo di amplificazione del gene specifico, sonde per le sequenze *wild-type* e per le mutazioni specifiche. La procedura e le regole di interpretazione del test sono analoghe a quelle utilizzate per gli altri LiPA.

La figura 10.7 illustra la posizione dei frammenti sulla striscia.

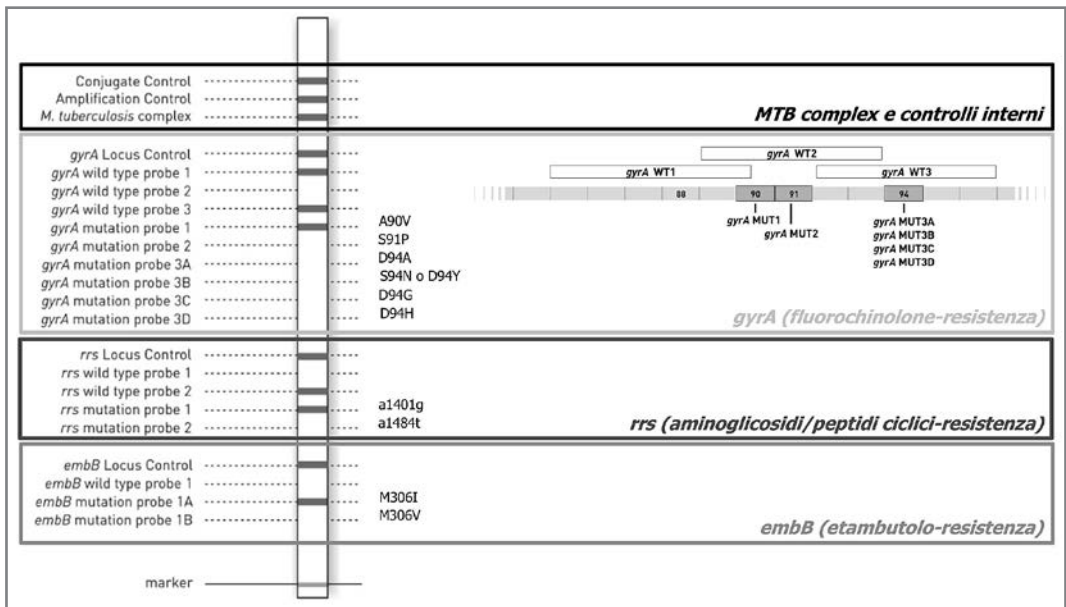


Fig. 10.7 - SONDE DEL SISTEMA GENOType MTBDRSL. POSIZIONE DELLE SONDE SULLA STRISCIA E RELATIVE REGIONI D'IBRIDIZZAZIONE NEI GENI *GIR*A, *RRS* E *EMB*B PER IL TEST GENOType MTBDRSL PER L'IDENTIFICAZIONE DI FARMACO-RESISTENZA A FLUOROCHINOLONI, FARMACI INIETTABILI DI SECONDA LINEA ED ETAMBUOLO.

Procedura e reagenti:

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Caratteristiche del test:

La resistenza a ciascun farmaco specifico è indicata dall'assenza di ibridazione con una o più sonde *wild-type* ed eventualmente dalla presenza di ibridazione delle corrispondenti sonde mutate.

Il test è da considerarsi non valido qualora manchi l'ibridazione con una o più sonde di controllo: universale e specifica per *Mycobacterium tuberculosis complex* e per i loci *gyrA*, *rrs* ed *embB*.

La sensibilità riportata in letteratura è del 70-90% per i fluorochinoloni, mentre è inferiore per i farmaci di seconda linea iniettabili, attestandosi tra 60% e 90% (8, 27, 31, 33, 44, 67). Tuttavia, alcuni studi riportano valori di sensibilità <50% (56). Anche in questo caso va ricordato che i valori predittivi del test dipendono dalla frequenza delle mutazioni negli isolati clinici che è variabile a seconda dell'area geografica (7, 19). La specificità del MTBDRsl per l'identificazione di resistenza a fluorochinoloni e farmaci di seconda linea iniettabili è superiore a 85%.

Per i problemi già accennati, relativi all'accuratezza del saggio fenotipico utilizzato come metodica di riferimento, la valutazione del test per l'etambutolo risulta più complessa. La maggior parte dei lavori riporta una sensibilità per l'identificazione di resistenza all'etambutolo compresa fra 70% e 80% e una specificità >85%, tuttavia non mancano Autori che riportano valori di sensibilità e specificità più bassi (31, 56).

In generale, si può concludere che il test ha un alto valore predittivo positivo e un'alta specificità e permette l'identificazione del fenotipo XDR in poche ore. La sua bassa sensibilità e il basso valore predittivo negativo, dovuti al fatto che solo alcune mutazioni responsabili del fenotipo di resistenza sono incluse nel test, richiedono la conferma mediante antibiogramma nei casi in cui le mutazioni non vengano evidenziate.

Il test risulta, quindi, utile per uno screening rapido dei casi di tubercolosi MDR considerati a rischio di XDR, quali i contatti di casi XDR e i fallimenti di regimi terapeutici di seconda linea.

10.2.3. METODICHE HOME-MADE

L'utilizzo di metodiche *home-made* permette di ricercare specifiche mutazioni note per essere associate a farmaco-resistenza. In particolare, il sequenziamento dei geni coinvolti nell'insorgenza di farmaco-resistenze rappresenta la metodica di scelta per la ricerca delle mutazioni meno frequenti; il numero di loci da analizzare rende tuttavia tale approccio piuttosto oneroso (tab. 2).

10.3. SVILUPPI FUTURI

La tecnologia dei *microarray*, combinata con la possibilità di eseguire amplificazioni *multiplex* in sistemi integrati, permette oggi l'analisi contemporanea di un gran numero di sequenze. Per quanto riguarda il rilevamento delle mutazioni associate a resistenze, questa tecnologia, anche se attualmente costosa e non di agevole esecuzione, pare assai promettente.

L'inserimento, in uno stesso *array*, sia di sonde per l'identificazione delle mutazioni responsabili di farmaco-resistenza, sia di sonde per la genotipizzazione mediante *Spoligotyping* (vedi cap. 12), permetterebbe, con un singolo test, la caratterizzazione di ceppi sia a livello di farmaco-resistenza che di genotipo. Essendo ormai appurato che la frequenza delle singole mutazioni varia a seconda del genotipo, la conoscenza di quest'ultimo permetterà una più accurata valutazione dei valori predittivi positivo e negativo del risultato del test sul ceppo in esame. L'introduzione di sistemi automatizzati per la lettura dei microchip potrà semplificare l'interpretazione dei test.

È anche possibile che le tecnologie basate su *next generation sequencing* abbiano un grosso impatto sul rilevamento delle resistenze a livello genotipico; tale approccio è attualmente limitato dal

Tab. 2 - PRIMER CHE POSSONO ESSERE UTILIZZATI PER IL SEQUenziAMENTO GENICO DELLE REGIONI COINVOLTE NELLA FARMACO-RESISTENZA IN *M. TUBERCULOSIS*.

Farmaco-resistenza	Gene target	ID gene	Sequenze primer (5'- 3')
Rifampicina	<i>rpoB</i> (Rv0667) - RRDR	888164	GGGAGCGGATGACCACCCA GCGGTACGGCGTTTCGATGAAC
Isoniazide	<i>katG</i> (Rv1908c) - cod. 315	885638	CGGCGCATGGCCATGAACGACGTC CCGGCACCGGCGCCGTCCTTG
	<i>inhA</i> (Rv1484) - promoter	886523	CGAAGTGTGCTGAGTCACACCG CGATCCCCCGTTTCCTCCG
Etambutolo	<i>embB</i> (Rv3795) - seg. 1	886126	TTCTCCACCCGGCCGACC CAGCGCGCCACCGC
Pirazinamide	<i>pncA</i> (Rv2043c)	888260	TCAGGAGCTGCAAACCAACTCGACGCTGG GTCATGGACCCTATATCTGTGGCTGCCGCGTCG
Streptomycin	<i>rpsL</i> (Rv0682)	888259	GCCGACAAACAGAACGTGAAAGC GATCCGTAGACCGGGTCGTTG
	<i>rrs</i> (Rvnr01) - seg. 2	2700429	GGGTGACGGCCTACCAAG CCTATCTAGACGCGTCTG
Amikacina Kanamicina Capreomicina Viomicina	<i>rrs</i> (Rvnr01) - seg. 3	2700429	GCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAG GTACGGCTACCTTGTACGACTTC
	<i>eis</i> (Rv2416c) - promoter	885903	TATGCGTCGACGTGGGAGC TCGGTCGACCGTCAGCTCAT
Fluorochinoloni	<i>gyrA</i> (Rv0006) - QRDR	887105	CAATGTTTCGATCCGGCTTC CTCCATCGCCAACGGG
	<i>gyrB</i> (Rv0005)	887081	CGCGGCACGTAAGGCAC CCACATTGATGATCTTGCCCGC

costo dell'apparecchiatura e dalla necessità di eseguire molte sequenze per ammortizzare i costi dei reagenti. Lo sviluppo di sequenziatori "usa e getta", di cui esistono già dei prototipi, permetterà di eseguire sequenze a costi molto contenuti.

Problematiche ancora irrisolte sono quelle relative alla riproducibilità delle sequenze e all'interpretazione dei dati ottenuti. Non essendo le mutazioni nei geni implicati nel meccanismo di resistenza a un determinato farmaco tutte responsabili del fenotipo resistente, l'interpretazione delle nuove mutazioni richiede estrema cautela.

10.4 PROBLEMI INTERPRETATIVI ASSOCIATI ALL'USO DEI TEST MOLECOLARI SU LARGA SCALA

Un test diagnostico non è praticamente mai 100% specifico o sensibile e il numero di falsi positivi e falsi negativi dipende dalla prevalenza della condizione in esame nella popolazione oggetto di studio. Nel caso specifico della resistenza alla rifampicina, i test molecolari danno risultati sufficientemente specifici solo se utilizzati in popolazioni con rischio di tubercolosi MDR >10%. Nel caso in cui sistemi come Xpert MTB/Rif o LiPA vengano utilizzati per lo screening di pazienti non selezio-

nati, in Italia, dove la probabilità pre-test di tubercolosi MDR è di molto inferiore al 10%, le eventuali resistenze devono essere confermate con un test alternativo. Al contrario, i pazienti ad alto rischio per MDR-TB (provenienti da Paesi ad alta incidenza di MDR, con storia di precedenti trattamenti antitubercolari, contatti di pazienti MDR, ritrattati dopo un fallimento terapeutico) sono il target ideale per questo tipo di test.

10.5. CONCLUSIONI

I test molecolari possono essere vantaggiosamente utilizzati in laboratorio quando sia richiesta una determinazione rapida del profilo di sensibilità ai farmaci. Comunque, poiché sono note solo alcune delle mutazioni associate ai fenotipi resistenti, questi test al momento non possono essere considerati sostitutivi dell'antibiogramma colturale e i risultati ottenuti devono essere sempre confermati da test fenotipici. Inoltre, a causa del costo elevato, non sono realisticamente utilizzabili di routine. Un'applicazione con un rapporto costo-beneficio accettabile potrebbe essere quella che ne prevede l'utilizzo in gruppi a rischio di tubercolosi MDR o XDR e nei casi di risultato dubbio dell'antibiogramma fenotipico.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida da Silva P.E., Palomino J.C., *Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs*, 2011, J Antimicrob Chemother, 2011; 66:1417-1430.
2. Banerjee A., Dubnau E., Quémard A., Balasubramanian V., Um K.S., Wilson T., Collins D., de Lisle G., Jacobs W.R. Jr., *inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis*, 1994, Science; 263:227-230.
3. Banerjee A., Sugantino M., Sacchetti J.C., Jacobs W.R., *The mabA gene from the inhA operon of Mycobacterium tuberculosis encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance*, 1998, Microbiology; 144:2697-2704.
4. Blumberg H.M., Burman W.J., Chaisson R.E., Daley C.L., Etkind S.C., Friedman L.N., Fujiwara P., Grzemska M., Hopewell P.C., Iseman M.D., Jasmer R.M., Koppaka V., Menzies R.I., O'Brien R.J., Reves R.R., Reichman L.B., Simone P.M., Starke J.R., American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and the Infectious Diseases Society, *Treatment of tuberculosis*, 2003, Am J Respir Crit Care Med; 167:603-662.
5. Bodmer T., Zurcher G., Imboden P., Telenti A., *Mutation position and type of substitution in the bsubunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis*, 1995, J Antimicrob Chemother; 35:345-348.
6. Booniam S., Chairprasert A., Prammananan T., Leechawengwongs M., *Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand*, 2010, Clin Microbiol Infect; 16:396-399.
7. Borrell S., Gagneux S., *Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*, Clin Microbiol Infect, 2011; 17:815-820.
8. Brossier F., Veziris N., Aubry A., Jarlier V., Sougakoff W., *Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates*, 2010, J Clin Microbiol; 48:1683-1689.
9. Brossier F., Veziris N., Truffot-Pernot C., Jarlier V., Sougakoff W., *Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis*, 2011, Antimicrob Agents Chemother; 55:355-360.
10. Caminero J.A., Sotgiu G., Zumla A., Migliori G.B., *Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis*, 2010, Lancet Infect Dis; 10:621-629.
11. Campbell P.J., Morlock G.P., Sikes R.D., Dalton T.L., Metchock B., Starks A.M., Hooks D.P., Cowan L.S., Plikaytis B.B., Posey J.E., *Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*, 2011, Antimicrob Agents Chemother; 55:2032-2041.
12. Chen W., Biswas T., Porter V.R., Tsodikov O.V., Garneau-Tsodikova S., *Unusual regioversatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-TB*, 2011, Proc Natl Acad Sci USA; 108:9804-9808.
13. Coelho M.B., Costa E.R., Vasconcellos S.E., Linck N., Ramos R.M., Amorim H.L., Suffys P.N., Santos A.R.,

- Silva P.E., Ramos D.F., Silva M.S., Rossetti M.L., *Sequence and structural characterization of tbnat gene in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis: identification of new mutations*, 2011, *Mutat Res*; 712:33-39.
14. Coker R.J., *Multidrug-resistant tuberculosis: public health challenges*, 2004, *Trop Med Int Health*; 9:25-40.
 15. Comas I., Gagneux S. *The past and future of tuberculosis research*, 2009, *PLoS Pathog*; 5:e1000600.
 16. da Silva P.E., Von Groll A., Martin A., Palomino J.C., *Efflux as a mechanism for drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*, 2011, *FEMS Immunol Med Microbiol*; 63:1-9.
 17. DeBarber A.E., Mdluli K., Bosman M., Bekker L.G., Barry C.E. III, *Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis*, 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*; 97:9677-9682.
 18. De Rossi E., Ainsa J.A., Riccardi G., *Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question*, 2006, *FEMS Microbiol Rev*; 30:36-52.
 19. Gagneux S., Small P.M., *Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development*, 2007, *Lancet Infect Dis*; 7:328-337.
 20. Gandhi N.R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H.S., Zignol M., van Soolingen D., Jensen P., Bayona J., *Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis*, 2010, *Lancet*; 375:1830-1843.
 21. Georghiou S.B., Magana M., Garfein R.S., Catanzaro D.G., Catanzaro A., Rodwell T.C., *Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review*, 2012, *PLoS One*; 7:e33275.
 22. Ghebreyesus T.A., Kazatchkine M., Sidibé M., Nakatani H., *Tuberculosis and HIV: time for an intensified response*, 2010, *Lancet*; 375:1757-1758.
 23. Gillespie S.H., *Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective*, 2002, *Antimicrob Agents Chemother*; 46:267-274.
 24. Ginsburg A.S., Woolwine S.C., Hooper N., Benjamin W.H. Jr., Bishai W.R., Dorman S.E., Sterling T.R., *The rapid development of fluoroquinolone resistance in M. tuberculosis*, 2003, *N Engl J Med*; 349:1977-1978.
 25. Hegde S.S., Vetting M.W., Roderick S.L., Mitchenall L.A., Maxwell A., Takiff H.E., Blanchard J.S., *A fluoroquinolone resistance protein from Mycobacterium tuberculosis that mimics DNA*, 2005, *Science*; 308:1480-1483.
 26. Hillemann D., Rüsche-Gerdes S., Richter E., *Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens*, 2007, *J Clin Microbiol*; 45:2635-2640.
 27. Hillemann D., Rüsche-Gerdes S., Richter E., *Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens*, 2009, *J Clin Microbiol*; 47:1767-1772.
 28. Johansen S.K., Maus C.E., Plikaytis B.B., Douthwaite S., *Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs*, 2006, *Molecular Cell*; 23:173-182.
 29. Johnson R., Streicher E.M., Louw G.E., Warren R.M., van Helden P.D., Victor T.C., *Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*, 2006, *Curr Issues Mol Biol*; 8:97-111.
 30. Kelley C.L., Rouse D.A., Morris S.L., *Analysis of ahpC gene mutations in isoniazid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis*, 1997, *Antimicrob Agents Chemother*; 41:2057-2058.

31. Kiet V.S., Lan N.T., An D.D., Dung N.H., Hoa D.V., van Vinh Chau N., Chinh NT., Farrar J., Caws M., *Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*, J Clin Microbiol, 2010; 48:2934-2939.
32. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J., *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks*, 2010, Nat Rev Microbiol; 8:423-435.
33. Kontsevaya I., Mironova S., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Mitchell S., Drobniewski F., *Evaluation of two molecular assays for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis resistance to fluoroquinolones in high-tuberculosis and -multidrug-resistance settings*, 2011, J Clin Microbiol; 49:2832-2837.
34. Lacombe A., Garcia-Sierra N., Prat C., Ruiz-Manzano J., Haba L., Rosés S., Maldonado J., Domínguez J., *GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains and clinical samples*, 2008, J Clin Microbiol; 46:3660-3667.
35. Lee A.S., Teo A.S., Wong S.Y., *Novel mutations in ndh in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates*, 2001, Antimicrob Agents Chemother; 45:2157-2159.
36. Lemaitre N., Sougakoff W., Truffot-Pernot C., Jarlier V., *Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase pncA*, 1999, Antimicrob Agents Chemother; 43:1761-1763.
37. Li X.Z., Nikaido H., *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*, 2009, Drugs; 69:1555-1623.
38. Ling D.I., Zwerling A.A., Pai M., *GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis*, 2008, Eur Respir J; 32:1165-1174.
39. Ling D.I., Zwerling A.A., Pai M., *Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy*, 2008, Expert Rev Respir Med; 2:583-588.
40. Louw G.E., Warren R.M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C.R., Van Helden P.D., Victor T.C. *A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance*, 2009, Antimicrob. Agents Chemother; 53:3181-3189.
41. Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M., *Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in Mycobacterium tuberculosis*, 2005, Antimicrob Agents Chemother; 49:3192-3197.
42. Mérens A., Matrat S., Aubry A., Lascols C., Jarlier V., Soussy C.J., Cavallo J.D., Cambau E., *The pentapeptide repeat proteins MfpAMt and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex*, 2009, J Bacteriol; 191:1587-1594.
43. Migliori G.B., Lange C., Centis R., Sotgiu G., Mütterlein R., Hoffmann H., Kliiman K., De Iaco G., Lauria F.N., Richardson M.D., Spanevello A., Cirillo D.M., *TBNET Study Group Resistance to second-line injectables and treatment outcomes in multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis cases*, 2008, Eur Respir J; 31:1155-1159.
44. Miotto P., Cabibbe A.M., Mantegani P., Borroni E., Fattorini L., Tortoli E., Migliori G.B., Cirillo D.M., *GenoType MTBDRsl performance on clinical samples with diverse genetic background*, 2012, Eur Respir J; 40:690-698.
45. Miotto P., Piana F., Cirillo D.M., Migliori G.B., *Genotype MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*, 2008, J Clin Microbiol; 46:393-394.
46. Mironova S., Pimkina E., Kontsevaya I., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Skenders G., Kummik T., Drobn-

- niewski F., *Performance of the GenoType MTBDRPlus assay in routine settings: a multicenter study*, 2012, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31:1381-1387.
47. Moore D.A., Shah N.S., *Alternative methods of diagnosing drug resistance – what can they do for me?*, 2011, *J Infect Dis*; 204:S1110-1119.
 48. Morgan M., Kalantri S., Flores L., Pai M., *A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*, 2005, *BMC Infect Dis*; 5:62.
 49. Morlock G.P., Metchock B., Sikes D., Crawford J.T., Cooksey R.C., *ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates*, 2003, *Antimicrob Agents Chemother*; 47:3799-3805.
 50. O'Grady J., Maeurer M., Mwaba P., Kapata N., Bates M., Hoelscher M., Zumla A., *New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis*, 2011, *Curr Opin Pulm Med*; 17:134-141.
 51. Okamoto S., Tamaru A., Nakajima C., Nishimura K., Tanaka Y., Tokuyama S., Suzuki Y., Ochi K., *Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria*, *Mol Microbiol*, 2007; 63:1096-1106.
 52. Pai M., Kalantri S., Dheda K., *New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance*, 2006, *Expert Rev Mol Diagn*; 6:423-432.
 53. Piton J., Petrella S., Delarue M., André-Leroux G., Jarlier V., Aubry A., Mayer C., *Structural insights into the quinolone resistance mechanism of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase*, 2010, *PLoS One*; 18; 5:e12245.
 54. Plinke C., Cox H.S., Kalon S., Doshetov D., Rüsche-Gerdes S., Niemann S., *Tuberculosis ethambutol resistance: concordance between phenotypic and genotypic test results*, 2009, *Tuberculosis*; 89:448-452.
 55. Ramaswamy S., Musser J.M., *Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis*, 1998, *Tubercle Lung Dis*; 79:3-29.
 56. Said H.M., Kock M.M., Ismail N.A., Baba K., Omar S.V., Osman A.G., Hoosen A.A., Ehlers M.M., *Evaluation of the GenoType MTBDRsl assay for susceptibility testing of second-line anti-tuberculosis drugs*, 2012, *Int J Tuberc Lung Dis*; 16:104-109.
 57. Shi W., Zhang X., Jiang X., Yuan H., Lee J.S., Barry C.E. III, Wang H., Zhang W., Zhang Y., *Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis*, 2011, *Science*; 333:1630-1632.
 58. Sintchenko V., Chew W.K., Jelfs P.J., Gilbert G.L., *Mutations in rpoB gene and rifabutin susceptibility of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Australia*, 1999, *Pathology*; 31:258-260.
 59. Slayden R.A., Barry C.E. III, *The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis*, 2000, *Microbes Infect*; 2:659-669.
 60. Sohn H., Minion J., Albert H., Dheda K., Pai M., *TB diagnostic tests: how do we figure out their costs?*, 2009, *Expert Rev Anti Infect Ther*; 7:723-733.
 61. Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Deretic V., Musser J.M., *Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and -susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities*, 1997, *Antimicrob Agents Chemother*; 41:600-606.
 62. Srivastava S., Garg A., Ayyagari A., Nyati K.K., Dhole T.N., Dwivedi S.K., *Nucleotide polymorphism associated with ethambutol resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis*, 2006, *Curr Microbiol*; 53:401-405.

63. Srivastava S., Pasipanodya J.G., Meek C., Leff R., Gumbo T., *Multidrug-resistant tuberculosis not due to noncompliance but to between-patient pharmacokinetic variability*, 2011, *J Infect Dis*; 204:1951-1959.
64. Suzuki Y., Nakajima C., Tamaru A., Kim H., Matsuba T., Saito H., *Sensitivities of ciprofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates to fluoroquinolones: role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance*, 2012, *Int J Antimicrob Agents*; 39:435-439.
65. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T., *Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis*, 1993, *Lancet*; 341:647-650.
66. Tortoli E., Marcelli F., *Use of the INNO LiPA Rif.TB for detection of Mycobacterium tuberculosis DNA directly in clinical specimens and for simultaneous determination of rifampin susceptibility*, 2006, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 21:51-55.
67. van Ingen J., Simons S., de Zwaan R., van der Laan T., Kamst-van Agterveld M., Boeree M.J., van Soolingen D., *Comparative study on genotypic and phenotypic second-line drug resistance testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates*, 2010, *J Clin Microbiol*; 48:2749-2753.
68. Vetting M.W., Magnet S., Nieves E., Roderick S.L., Blanchard J.S., *A bacterial acetyltransferase capable of regioselective N-acetylation of antibiotics and histones*, 2004, *Chem Biol*; 11:565-573.
69. Vilchèze C., Av-Gay Y., Attarian R., Liu Z., Hazbón M.H., Colangeli R., Chen B., Liu W., Alland D., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Jr., *Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in Mycobacterium tuberculosis*, 2008, *Mol Microbiol*; 69:1316-1329.
70. Vilchèze C., Weisbrod T.R., Chen B., Kremer L., Hazbón M.H., Wang F., Alland D., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Jr., *Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria*, 2005, *Antimicrob Agents Chemother*; 49:708-720.
71. Wang X.D., Gu J., Wang T., Bi L.J., Zhang Z.P., Cui Z.Q., Wei H.P., Deng J.Y., Zhang X.E., *Comparative analysis of mycobacterial NADH pyrophosphatase isoforms reveals a novel mechanism for isoniazid and ethionamide inactivation*, 2011, *Mol Microbiol*; 82:1375-1391.
72. Wilson M.L., *Recent advances in the laboratory detection of Mycobacterium tuberculosis complex and drug resistance*, 2011, *Clin Infect Dis*; 52:1350-1355.
73. Zaunbrecher M.A., Sikes R.D. Jr., Metchock B., Shinnick T.M., Posey J.E., *Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis*, 2009, *PNAS*; 106:20004-20009.
74. Zhang Y., Mitchison D., *The curious characteristics of pyrazinamide: a review*, 2003, *Int J Tuberc Lung Dis*; 7:6-21.
75. Zhang Y., Yew W.W., *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*, 2009, *Int J Tuberc Lung Dis*; 13:1320-1330.

Capitolo II

RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX DA CAMPIONI CLINICI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE GENICA

Claudio Piersimoni

11. RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX DA CAMPIONI CLINICI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE GENICA

La necessità di disporre di un test rapido per la diagnosi di tubercolosi ha portato allo sviluppo delle tecniche di amplificazione mirate alla ricerca di *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) direttamente nei campioni clinici, sia respiratori che extrapulmonari. Queste tecniche, siano esse *in-house* oppure commerciali, sono diventate oggi parte integrante della diagnostica microbiologica della tubercolosi (3, 25, 53). Esse permettono di rilevare sequenze nucleotidiche bersaglio caratteristiche di MTC, mediante l'amplificazione del loro numero, dal momento che, in poche ore, è possibile ottenerne milioni di copie. Vengono così abbreviati enormemente i tempi della diagnosi rispetto a quelli relativamente lunghi richiesti dall'esame colturale, fermo restando che l'esame colturale è comunque indispensabile perché ha maggiore sensibilità e permette l'isolamento del ceppo e l'esecuzione dell'antibiogramma. Data l'ampia diffusione nei laboratori di micobatteriologia dei sistemi commerciali di amplificazione genica e la loro rilevanza nella letteratura specializzata, il presente capitolo è dedicato esclusivamente ai sistemi commerciali disponibili in Italia.

11.1. GENERALITÀ

11.1.1. TRANSCRIPTION MEDIATED AMPLIFICATION (TMA)

Il metodo utilizza una coppia di *primer* e tre enzimi (transcriptasi inversa, RNasi e RNA-polimerasi) per produrre DNA dall'acido nucleico bersaglio (rRNA 16S); tale DNA verrà utilizzato a sua volta come stampo per la trascrizione di nuovo RNA (fig. 11.1). Poiché ogni DNA stampo permette di produrre un notevole numero di copie (da 10^2 a 10^3) di RNA amplificato, definito "amplicone", questo processo può portare alla produzione di 10^9 ampliconi in un'ora (39).

La TMA è una reazione isotermica (42°C) estremamente veloce, potendo produrre in 15-30 minuti una quantità di amplificato che, con la PCR convenzionale, non può essere ottenuto prima di 3-4 ore.

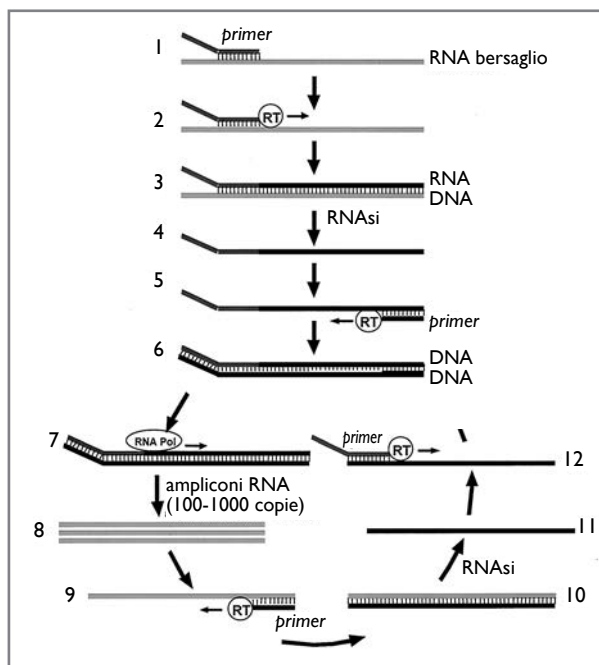


Fig. 11.1 - RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA TECNICA TMA (RT, TRANSCRIPTASI INVERSA; RNA POL, RNA POLIMERASI).

11.1.2. NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION (NASBA)

Si basa sulla attività coordinata di tre enzimi (T7 RNA-polimerasi, RNasi H e AMV transcriptasi inversa), i quali, in presenza di una coppia di *primer*, amplificano il target rappresentato da RNA a livello di 10^9 ampliconi in circa 90 minuti (20). Dopo un passaggio iniziale a 65 °C per 5 minuti, la reazione procede isotermicamente a 41 °C con un meccanismo analogo a quello descritto per la TMA.

11.1.3. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La reazione a catena della polimerasi utilizza una coppia di *primer* e l'enzima DNA-polimerasi per amplificare un segmento di DNA. Usando cicli termici comprendenti una fase di denaturazione del DNA, a temperatura elevata, una fase di appaiamento dei *primer*, a temperatura più bassa, e una fase di estensione del filamento, a temperatura intermedia, si realizza l'amplificazione esponenziale della sequenza bersaglio (fig. 11.2).

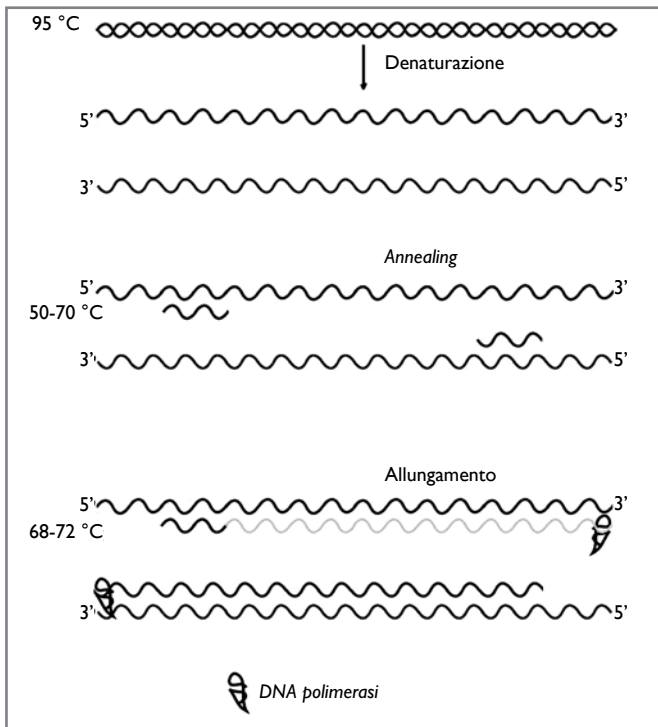


Fig. 11.2 - RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA TECNICA PCR.

Per la ricerca di MTC sono state utilizzate come bersaglio varie sequenze di DNA, le più note sono l'rDNA 16S, il gene che codifica per la proteina da shock termico da 65 kDa e la sequenza di inserzione 6110 (IS6110), che è presente in molte copie nel genoma di MTC (26).

Per quanto riguarda le PCR *in-house*, molti sono i dati sperimentali che riportano buoni risultati di sensibilità, non solo in campioni respiratori ma anche negli extrapulmonari. Recentemente, tuttavia, si è posta l'attenzione sulla necessità di standardizzare i protocolli operativi della PCR al fine

di garantire una maggiore riproducibilità dei risultati (5), tanto più che precedenti studi miranti a valutare l'affidabilità della PCR per la ricerca diretta di MTC avevano fatto emergere considerevoli percentuali di false positività nei laboratori partecipanti al controllo di qualità (51). I kit commerciali sono meno sensibili ma più standardizzati e progettati per minimizzare l'incidenza delle contaminazioni da *carry-over* e sono, pertanto, comunemente utilizzati nei laboratori di microbiologia clinica per la ricerca diretta di MTC.

11.1.4. STANDARD DISPLACEMENT AMPLIFICATION (SDA)

La tecnologia SDA utilizza come target l'IS6110 presente in più copie all'interno del genoma di MTC. Il meccanismo di amplificazione, che è molto complesso, viene qui di seguito riportato in estrema sintesi. Nella fase iniziale (amplificazione del target), l'amplificazione parte da due coppie di *primer* complementari a sequenze nucleotidiche contigue all'interno del target. L'allungamento del *primer* "a monte" (*bumper*) causa il distacco del *primer* "a valle", che nel contempo si allunga, fino alla sua completa liberazione. Su quest'ultimo è presente anche un sito di restrizione. Nella fase di amplificazione esponenziale, un nuovo *primer* si lega all'amplicone e si estende formando un doppio filamento; contemporaneamente, per effetto della digestione da parte dell'enzima di restrizione, l'amplicone originale si scinde in due frammenti di cui quello "a monte" agisce da *bumper* e spiazza il frammento "a valle" (fig. 11.3).

L'amplificazione e la rilevazione sono isotermitiche (52,5 °C) e avvengono simultaneamente con modalità *real-time* (43). Il prodotto di amplificazione viene evidenziato mediante ibridizzazione con una sonda del tipo *molecular beacon* e conseguente emissione di segnale fluorescente.

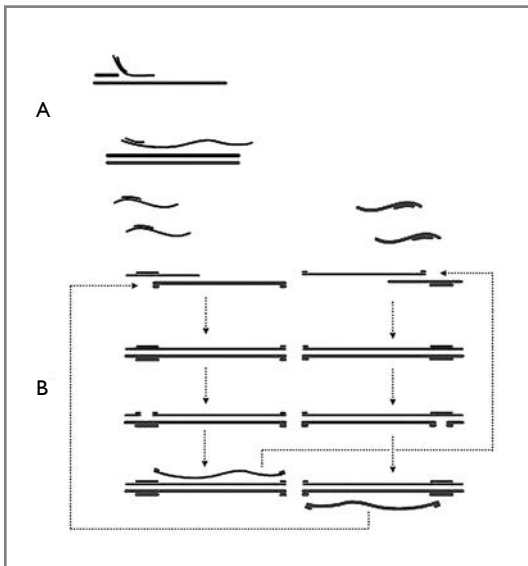


Fig. 11.3 - RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELLA TECNICA SDA (A, AMPLIFICAZIONE LINEARE INIZIALE; B, AMPLIFICAZIONE ESPONENZIALE).

11.1.5. REAL-TIME PCR (RT-PCR)

La RT-PCR si basa sulla rilevazione e quantificazione di un segnale la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di amplificato prodotto. Dato che il segnale viene misurato a ogni ciclo, l'amplificazione risulta costantemente monitorata. Nella RT-PCR il numero di cicli necessari al raggiungimento di un segnale soglia, C_T (*threshold cycle*), è inversamente proporzionale alla quantità di target presente nel campione. Il collocamento del C_T all'interno della fase esponenziale di amplificazione fa sì che il risultato sia di gran lunga più affidabile di quello ottenibile in *end-point* con la PCR tradizionale (6).

La RT-PCR offre numerosi vantaggi rispetto alla PCR tradizionale:

- è più rapida, dal momento che il rilevamento è contemporaneo, e non successivo, all'amplificazione;

- il rilevamento dell'amplificato mediante sonde garantisce un'elevata specificità;
- il sistema di *detection* in fluorescenza garantisce una maggiore sensibilità e consente l'uso di un'ampia gamma di strumenti per la quantificazione dell'amplificato;
- la possibilità di realizzare amplificazione e *detection* all'interno di un sistema chiuso minimizza il rischio di contaminazioni crociate da ampliconi.

Non essendo, nella RT-PCR, possibile determinare il peso molecolare dell'amplificato, la specificità dell'amplificazione può essere verificata mediante l'analisi delle curve di *melting*. Tali curve, che riportano la cinetica di dissociazione delle sequenze complementari di acido nucleico in funzione della temperatura, non risultano infatti sovrapponibili in presenza di ampliconi di diversa lunghezza (aspecifici).

Nella RT-PCR la possibilità di impiego delle tecniche *multiplex* è limitata.

Attualmente è disponibile un'ampia varietà di metodi per il rilevamento dell'amplificato; essi sono tuttavia riconducibili a due formati e possono essere utilizzati con procedimenti sia qualitativi che quantitativi.

- Rilevamento indiretto.

Vengono utilizzati fluorocromi (bromuro di etidio, SYBR *green*) che si intercalano al DNA a doppia elica. Essi rilevano quindi tutti i prodotti di PCR, sia specifici che aspecifici. Questi metodi richiedono una scrupolosa ottimizzazione delle condizioni di PCR e una differenziazione attenta dei prodotti di amplificazione attraverso l'analisi delle curve di fusione.

- Rilevamento diretto.

Si utilizzano sonde marcate con fluorofori, strutturate in modo che il segnale venga rilasciato solo successivamente all'ibridizzazione con la sequenza target. Si distinguono i seguenti tipi di sonda:

- sonda di idrolisi (5' nucleasi, *TaqMan*). Si tratta di un corto oligonucleotide con un fluorocromo in posizione 5' il cui segnale è annullato da un *quencher* in posizione 3'. Sia la sonda che il *primer*, entrambi presenti nel mezzo di reazione, si legano al bersaglio, ma quando l'allungamento del *primer* raggiunge la regione del bersaglio ibridizzata alla sonda, la *Taq* polimerasi, che ha attività esonucleasica, provoca l'idrolisi di quest'ultima e, rendendo indipendenti fluorocromo e *quencher*, determina l'emissione del segnale fluorescente (fig. 11.4).
- oligonucleotide lineare (sonde FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Si utilizzano due sonde disegnate in maniera tale da ibridizzare con regioni contigue della sequenza bersaglio. La prima sonda è marcata all'estremità 3' con un fluoroforo donatore, mentre la seconda è marcata all'estremità 5' con un fluoroforo accettore. Dopo l'ibridizzazione col target, l'estremità 5' della prima sonda viene a trovarsi in vicinanza dell'estremità 3' della seconda e il donatore induce l'accettore a emettere il segnale fluorescente (fig. 11.4);
- *molecular beacon*. Si tratta di sonde che contengono un fluoroforo e un *quencher*. Nella configurazione sterica di partenza (a forcina), le due molecole sono ravvicinate e non si ha emissione di segnale. Al momento dell'ibridizzazione con la sequenza bersaglio, la "forcina" si distende provocando l'allontanamento del *quencher* dal fluoroforo con conseguente emissione di segnale (fig. 11.4).

11.1.5.1. STRUMENTAZIONE

Numerosi strumenti sono disponibili in commercio per l'esecuzione di test in RT-PCR (27).

Vale la pena di ricordare che gli strumenti a maggiore capacità analitica (≥ 96 pozzetti) hanno una

termociclazione più lenta rispetto agli strumenti a più bassa capacità. Tutti gli strumenti supportano la lettura dei fluorofori impiegati nelle sonde *TaqMan* e *molecular beacon*, mentre solamente la strumentazione *LightCycler* (Roche) è in grado di rilevare le sonde FRET e di analizzarne le relative curve di fusione. La quantificazione del target è possibile con qualunque strumento.

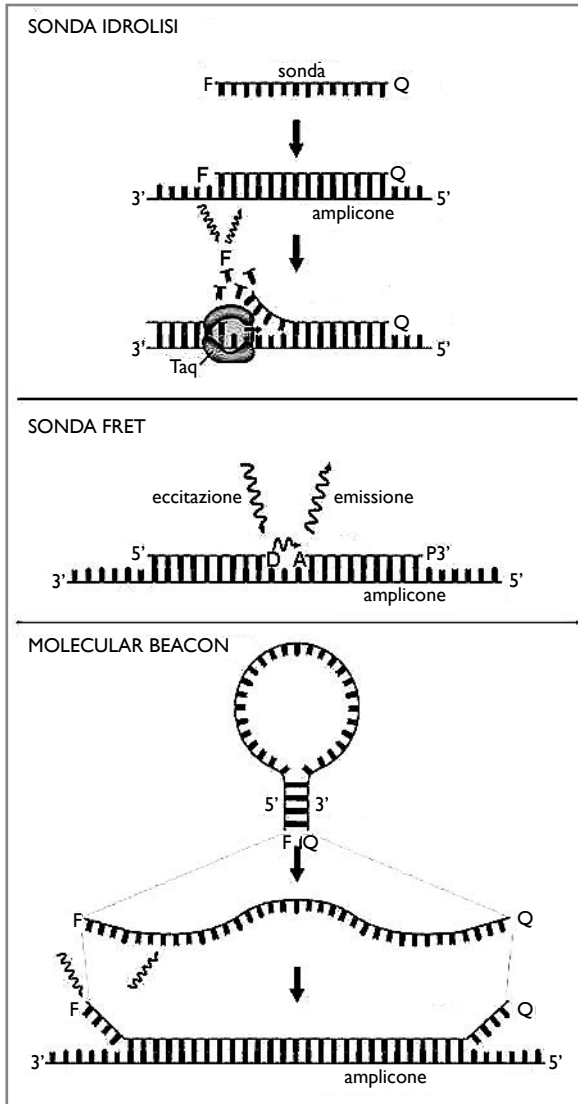


Fig. 11.4 - SONDE UTILIZZATE NELLA RT-PCR. F, FLUOROCROMO; Q, QUENCHER; D, DONATORE; A, ACCETTORE.

11.2. TEST COMMERCIALI

11.2.1. AMPLIFIED *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DIRECT TEST (MTD2)

Principio:

Il test MTD2 (bioMérieux) si avvale della tecnica isoterma *Transcription Mediated Amplification* ed è commercializzato in un formato interamente manuale, privo di controllo interno di amplificazione.

Dopo la fase iniziale di lisi batterica, ottenuta mediante sonicazione, e di denaturazione termica del target, costituito da rRNA 16S, quest'ultimo viene amplificato a 42 °C, tramite la trascrizione di molecole intermedie di DNA. Gli ampliconi prodotti vengono fatti ibridizzare con una sonda specifica di DNA a singola elica, marcata con esteri di acridinio. Al momento dell'ibridazione l'estere di acridinio si intercala nella doppia elica risultando quindi protetto dall'azione idrolitica di un apposito reagente di selezione, mentre il marcatore della sonda non legata, privo di protezione, viene idrolizzato (*Hybridization Protection Assay*). L'avvenuta ibridazione è evidenziata mediante un chemiluminometro che rileva le radiazioni luminose emesse dagli esteri di acridinio opportunamente eccitati. L'intera sequenza di amplificazione e rilevazione avviene in un'unica provetta e si completa in meno di tre ore; non vi sono fasi di lavaggio.

MTD2 è attualmente l'unico test commerciale validato dalla US Food and

Drug Administration (FDA) per la ricerca qualitativa di MTC da campioni respiratori sia positivi che negativi all'esame microscopico (11, 13, 14, 15). La letteratura riporta un generale consenso sull'utilità di questo test per l'evidenziazione rapida di MTC in materiali respiratori. Recenti dati sembrano confermare una buona performance anche su materiali quali pus, biopsie e liquido cefalo-rachidiano (40, 52, 59, 61). Il test si è rivelato sensibile e specifico anche se sono stati segnalati casi di false positività in presenza di *Mycobacterium celatum* (19).

Procedimento:

Sebbene le istruzioni del kit ne prevedano l'uso su campioni decontaminati con NALC-NaOH, sono stati riportati buoni risultati anche dopo decontaminazione con dodecil-solfato di sodio.

Poiché il target è una molecola deperibile (RNA), i campioni non possono essere refrigerati a 4 °C per più di 2-3 giorni. Se non è possibile eseguire il test entro questo lasso di tempo è necessario congelare i campioni a -20 °C o a -80 °C, condizione nella quale possono rimanere stabili per mesi. La quota di campione utilizzata per il test è di 450 µL.

Il sistema MTD2 necessita, oltre che del chemiluminometro (Leader 50i), di un sonicatore a vascia e di blocchi riscaldanti a 42 °C, 60 °C e 95 °C. 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 di sodio, allo scopo di distruggere eventuali residui di RNA formatosi in amplificazioni precedenti. I reagenti contenuti nel kit permettono l'esecuzione di 50 test. La lettura del test considera negativi valori di *Relative Light Unit* (RLU) <30.000 e positivi valori di RLU >500.000. I campioni con valori di RLU compresi tra 30.000 e 500.000 vanno considerati dubbi e il test deve essere ripetuto. In un test ripetuto, un valore >30.000 RLU va considerato positivo.

Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit, disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

La procedura prevede l'inserimento di controlli di amplificazione positivi (che contengono RNA purificato) e negativi, che vengono forniti insieme al kit: ai controlli non è necessario applicare le procedure di estrazione (sonicazione e incubazione a 95 °C). Si considerano accettabili valori <20.000 RLU per il controllo negativo e valori >500.000 RLU per il controllo positivo.

Dal momento che il kit è privo di controllo interno di amplificazione, nel caso in cui il test risulti negativo in presenza di esame microscopico positivo per bacilli alcol-acido-resistenti, è consigliabile verificare la presenza di inibitori dell'amplificazione nel campione. Tale verifica si esegue ripetendo il test con l'aggiunta, a 450 µL di campione, di 50 µL di una sospensione, di torbidità pari a 0,5 McFarland, di un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177 o 27294). Se il test risulta ancora negativo è dimostrata la presenza di inibitori. Una sospensione preparata come sopra può essere utilizzata anche per controllare la procedura di estrazione.

11.2.2. BD PROBETEC ET MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Principio:

Il sistema ProbeTec ET (Becton Dickinson) utilizza la tecnica isoterma *Strand Displacement Amplification* per l'amplificazione di IS6110. È commercializzato in un formato semiautomatico (estrazione manuale, amplificazione e rilevamento in modalità *real-time* eseguiti dallo strumento ProbeTec) dotato di controllo interno di amplificazione. Il sistema ProbeTec utilizza due micropozzetti monouso che contengono 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 l'enzima DNA polimerasi. Con ogni campione viene co-amplificato e rilevato un controllo interno. In base alla lettura del controllo interno di amplificazione i risultati del campione vengono riportati automaticamente come positivi, negativi o indeterminati.

Il test non è approvato dalla FDA ed è commercializzato per la ricerca qualitativa del DNA di MTC da campioni respiratori. I dati disponibili in letteratura mostrano che il sistema è robusto e affidabile, offrendo prestazioni paragonabili agli altri test presenti in commercio (29, 42, 56, 59). Esso sembra inoltre offrire una buona performance anche su campioni extrapolmonari (55, 60).

Procedimento:

Il sistema ProbeTec necessita, oltre che dello strumento omonimo che esegue simultaneamente le fasi di amplificazione e rivelazione, anche di due blocchi riscaldanti, un sondatore a vasca, un fornetto per l'inattivazione dei micobatteri e un'ultracentrifuga. La procedura, 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 reagenti contenuti nel kit consentono l'esecuzione di 96 test e possono essere conservati a temperatura ambiente. Il test richiede circa tre ore.

Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

La procedura prevede l'utilizzo di due controlli, positivo e negativo, per ogni seduta analitica. I controlli sono costituiti da acido nucleico e perciò non passano attraverso la fase di estrazione che si applica ai soli campioni clinici. La mancata lettura dei controlli non consente allo strumento la valutazione (positività o negatività) dei risultati, che vengono espressi in unità MOTA (*Method Other Than Acceleration*), utilizzate per la misura del segnale fluorescente emesso. Il *cut-off* è posto a quota 3400 MOTA. È consigliabile inserire un controllo positivo, in aggiunta a quelli presenti nel kit, che monitorizzi l'intera procedura analitica (estrazione inclusa) e un controllo negativo che monitorizzi l'eventuale contaminazione da DNA. Il controllo positivo può essere preparato a partire da un ceppo MTC di riferimento (ATCC 25177 o 27294).

11.2.3. GENOTYPE MYCOBACTERIA DIRECT

Principio:

Il kit GenoType Mycobacteria Direct (Hain Lifescience) è un test qualitativo che rileva la presenza di *Mycobacterium tuberculosis* complex e di quattro specie micobatteriche non tubercolari (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium malmoense*) direttamente da campioni clinici sia respiratori che extrapolmonari. Il target (rRNA 23S) viene amplificato avvalendosi della tecnologia NASBA, mentre l'identificazione dei prodotti di amplificazione viene ottenuta mediante ibridazione inversa in fase solida (LiPA). I dati pubblicati in letteratura non consentono di valutare adeguatamente il prodotto data l'esiguità numerica dei campioni studiati (28, 38, 49, 62, 63). Un solo lavoro esamina 1547 campioni, respiratori ed extrapolmonari, tutti negativi all'esame microscopico, ottenendo valori di sensibilità piuttosto bassi, 63,2% e 52,9%, rispettivamente. La specificità è superiore al 99% in entrambe le tipologie di campioni (7). In sintesi, considerando che la procedura di estrazione del test è piuttosto laboriosa e la sensibilità non eccelsa, l'unico vero vantaggio consiste nel poter identificare alcune importanti specie di micobatteri non tubercolari senza dover aspettare l'esito della coltura.

Procedimento:

Il test GenoType Mycobacteria Direct necessita, oltre che di un incubatore a 95 °C e di un bagno ultrasonico per la lisi, di un separatore magnetico per l'estrazione "a cattura" dell'RNA mediante biglie magnetiche e di un incubatore termostato regolabile (TwinCubator, Hain Lifesciences) per le successive fasi di amplificazione e ibridazione inversa. Essendo l'RNA una molecola deperibile, i campioni non possono essere refrigerati a 4 °C per più di 3 giorni prima di essere testati. È però possibile congelarli a -20 °C per non più di una settimana. Il test deve essere eseguito in due ambienti separati: uno per l'estrazione (quasi interamente manuale eseguibile in circa 90 minuti) e l'amplificazione, e l'altro per l'ibridazione inversa. La quota di RNA purificato utilizzata per l'amplificazione è di 10 µL, ottenuti a partire da un volume di campione decontaminato che va da un minimo di 500 a un massimo di 1000 µL. I materiali contenuti nei kit permettono l'esecuzione di 24 o 48 test. Il tempo complessivo di esecuzione del test è di cinque ore circa.

Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

Il kit fornisce un controllo positivo che può essere utilizzato sia come controllo interno di amplificazione sia per la verifica del processo di estrazione. La metodica prevede inoltre che venga incluso un controllo di contaminazione contenente acqua. Le strisce che supportano le sonde di ibridazione contengono due bande di controllo: una di controllo del coniugato, l'altra di controllo dell'amplificazione. Controlli preparati a partire da colture di ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177 o 27294) possono essere inseriti random fra i campioni della routine.

11.2.4. REALART MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS TM PCR KIT**Principio:**

Il kit RealArt utilizza la RT-PCR ed è commercializzato in un formato semiautomatico (estrazione manuale o automatizzata, amplificazione e rilevamento eseguibili con tutti gli strumenti che supportano i fluorofori impiegati nelle sonde TaqMan); è dotato di controllo interno di amplificazione.

È un test di amplificazione per la determinazione qualitativa e quantitativa di MTC direttamente da campioni clinici sia respiratori che extrapolmonari. Il target è costituito da una sequenza di 163 pb localizzata nel gene che codifica per l'rRNA 16S. I siti di legame dei primer identificano sequenze altamente conservate comuni a tutte le specie di *Mycobacterium tuberculosis* complex.

L'amplificato prodotto viene rilevato con una sonda TaqMan; questa, dopo l'ibridazione con il target, viene idrolizzata dalla Taq polimerasi dotata di attività esonucleasica, emettendo un segnale fluorescente.

I dati di letteratura a riguardo sono limitati a pochi lavori (18, 21, 34). Dall'esame di tali dati, il test RealArt mostra una sensibilità inferiore a MTD2 specialmente nei campioni negativi all'esame microscopico.

Procedimento:

Il test RealArt necessita, oltre che dello strumento che esegue simultaneamente amplificazione e rivelazione (il produttore suggerisce l'utilizzo della strumentazione ABI PRISM, Applied Biosystems, nelle versioni 7000, 7700 o 7900 HT), di un sistema di estrazione "a cattura" costituito da colonnine contenenti una membrana di gel di silicio (QIAmp DNA Minikit, Qiagen). L'estrazione manuale del DNA batterico utilizza un apposito protocollo che richiede circa due ore. Il recente

impiego di estrattori automatici sembra fornire risultati altrettanto validi (20). Il test, in virtù della peculiarità della RT-PCR, può essere eseguito in un'unica area.

La quota di DNA purificato utilizzata per il test è di 10 µL, ottenuti a partire da 500 µL di campione decontaminato. I materiali contenuti nel kit permettono l'esecuzione di 24, 48 o 96 test. Il tempo complessivo di esecuzione del test è di cinque ore circa. Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

La metodica RealArt prevede l'impiego di uno o di quattro controlli positivi a seconda che si esegua il test qualitativo o si desideri ottenere una quantificazione della carica batterica. Poiché non vi sono attualmente in letteratura dati a favore di un approccio diagnostico quantitativo, questo è per il momento sconsigliato. Il kit fornisce un controllo positivo che può essere utilizzato sia come controllo interno di amplificazione sia per la verifica del processo di estrazione. Controlli preparati a partire da colture di ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177 o 27294) possono essere inseriti random fra i campioni della routine.

11.2.5. COBAS TaqMan MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX TEST

Principio:

Il test COBAS TaqMan (Roche) utilizza la RT-PCR per la determinazione qualitativa di MTC da campioni respiratori. È dotato di controllo interno di amplificazione e viene commercializzato in un formato semiautomatico (estrazione manuale dei campioni, amplificazione e rilevamento automatizzati sullo strumento COBAS TaqMan). Il target è costituito da una regione del gene che codifica per il 16S rRNA; si tratta di una sequenza altamente conservata che include tratti sia genere- che specie-specifici. I primer biotinilati si legano alla parte genere-specifica del DNA bersaglio. Lo strumento COBAS TaqMan replica il processo di amplificazione per un numero programmato di cicli, monitorati mediante il rilevamento della fluorescenza liberata, al momento dell'idrolisi, dalle sonde TaqMan ibridizzate. Poiché la miscela di reazione contiene desossitimidina al posto della deossitimidina, gli ampliconi prodotti, diversamente dal DNA naturale, contengono uracile. Il test prevede il trattamento del campione da amplificare con l'enzima uracile-N-glicosilasi (AmpErase), che catalizza la reazione di distruzione del DNA contenente uracile, eliminando il rischio di contaminazioni da ampliconi prodotti in sedute precedenti. È presente un controllo interno di amplificazione costituito da DNA sintetico amplificabile con gli stessi primer usati per la sequenza target. Vengono utilizzate due differenti sonde TaqMan, una specifica per *Mycobacterium tuberculosis* complex e l'altra per il controllo interno, così che gli ampliconi del target e del controllo interno sono identificati in modo indipendente gli uni dagli altri.

I dati disponibili in letteratura sono contrastanti: alcuni (17, 37, 71) riportano per COBAS TaqMan una maggior sensibilità rispetto al precedente COBAS AMPLICOR (11, 12) sia nei campioni respiratori che in quelli extrapolmonari, altri (67) non riscontrano differenze. Il lavoro di Yang mostra una sensibilità piuttosto elevata (79,5%) nei campioni respiratori con microscopia negativa e coltura positiva (71).

Procedimento:

Il sistema COBAS TaqMan necessita, oltre che dello strumento omonimo e del relativo software applicativo (AMPLILINK) che eseguono automaticamente le fasi di amplificazione e rivelazione, di un blocco riscaldante e di una ultracentrifuga. La procedura dovrebbe essere teoricamente eseguita

in tre aree separate, una per la preparazione dei reagenti (*Master mix*), una per la preparazione del campione e dei controlli e 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 48 test. Il test può essere completato in circa 4 ore; la sensibilità dichiarata è di 5 copie/test, pari a circa 20 UFC/mL.

Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit fornite disponibili nella versione su CD.

Controllo di qualità:

In ogni blocco di 12 cuvette si devono inserire, oltre ai campioni (fino a un massimo di 10), due controlli, uno positivo e uno negativo. Per verificare la procedura di estrazione del DNA è necessario inserire un controllo positivo costituito da una sospensione di un ceppo di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177 o 27294).

11.2.6. GENEXPERT MTB/RIF SYSTEM

Principio:

GeneXpert (Cepheid) è una piattaforma completamente automatizzata in cui l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione mediante *emi-nested* RT-PCR si realizzano all'interno di una cartuccia monouso (figg. 11.5 e 11.6). La cartuccia si compone di: a) camere destinate a contenere il campione prima e dopo l'analisi, i reagenti liquidi e i prodotti di scarto; b) valvola, la cui rotazione consente ai reagenti di accedere alle diverse camere e al tubo di reazione; c) cella di reazione. Lo strumento utilizza un termociclatore dotato di rilevatore di fluorescenza (58).

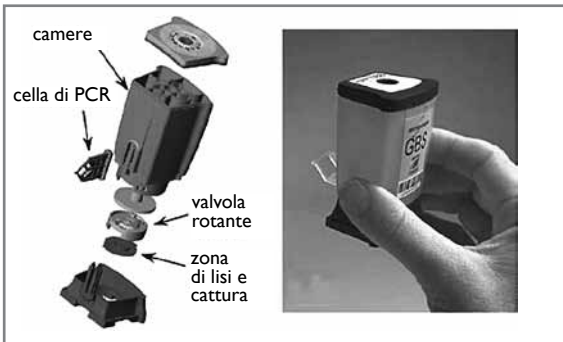


Fig. 11.5 - CARTUCCIA MONOUSO DEL SISTEMA XPERT MTB/RIF.

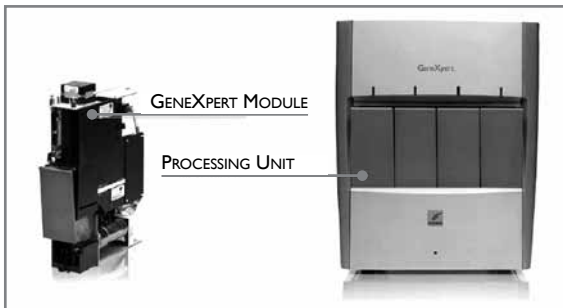


Fig. 11.6 - TERMOCICLATORE DEL SISTEMA XPERT MTB/RIF.

Il test permette il rilevamento semiquantitativo di MTC in campioni respiratori e il contemporaneo evidenziamento di eventuali mutazioni associate a rifampicino-resistenza. I primer amplificano una sequenza di 81 pb localizzata nella regione core del gene *rpoB*. L'amplificato prodotto viene rilevato a seguito dell'ibridazione con sonde *molecular beacon* che riconoscono vari frammenti della sequenza *wild-type*. In virtù della semplicità operativa, Xpert MTB/RIF è particolarmente adatto per i Paesi in via di sviluppo dove spesso mancano le infrastrutture e le conoscenze indispensabili per l'utilizzo dei tradizionali test di biologia molecolare. L'OMS, ben comprendendo l'enorme vantaggio che il test può offrire in tali *setting* nella lotta contro la tubercolosi, lo ha adottato ufficialmente e ne sostiene l'implementazione su larga scala (70).

I dati di letteratura su Xpert MTB/RIF sono numerosi e mostrano la buona performance del test sia sui campioni respiratori (per i quali è stato validato dal produttore) che su quelli extrapolmonari, con una particolare nota di merito per alcuni materiali notoriamente ostici, quali liquido cefalo-rachidiano, urine e aspirato gastrico. Non si può fare a meno di notare tuttavia che i risultati iniziali di sensibilità nell'identificazione di MTC, che avevano suscitato grande entusiasmo, sono stati in parte ridimensionati (tab. 1); ciò è dovuto al fatto che i primi studi, condotti in Paesi ad alta endemia tubercolare, includevano elevatissime proporzioni di campioni positivi all'esame microscopico (8, 30). La tabella 2 riporta le performance, su campioni extrapolmonari, di altri sistemi commerciali. Scendendo nel dettaglio delle valutazioni comparative, Xpert MTB/RIF appare più sensibile di COBAS TaqMan (17) e lievemente meno sensibile di MTD2 (64). I risultati dubbi prodotti da quest'ultimo sono però molto più numerosi degli "indeterminati" riscontrati con Xpert MTB/RIF. Nella maggior parte dei lavori pubblicati, i dati sulla *detection* della rifampicino-resistenza non sono valutabili a causa del numero ridotto di ceppi resistenti. Nei tre studi condotti su un numero di ceppi sufficientemente elevato (8, 9, 68) i dati di sensibilità e specificità sono molto buoni, oscillando fra il 94,4% e il 99% e fra il 98,3% e il 100% rispettivamente.

È stata rilevato un deficit di specificità per quanto riguarda il rilevamento delle resistenze (70), tanto che nei Paesi con bassa incidenza di rifampicino-resistenza, come l'Italia, è consigliata la verifica dei risultati di resistenza. Il problema sembrerebbe comunque in via di risoluzione a seguito della modifica del software e della commercializzazione di una nuova versione della cartuccia.

Procedimento:

La manualità di Xpert MTB/RIF è ridotta al minimo e non richiede alcuna competenza di biologia molecolare; i test sono eseguibili singolarmente. In breve, 0,5 mL di campione decontaminato vengono diluiti in 1,5 mL di *Sample Reagent* (una soluzione di sodio idrossido e isopropanolo progettata per l'utilizzo su campioni non decontaminati) e, una volta vortexati, vanno incubati per 15-20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, la cartuccia viene inoculata con il campione, registrata (mediante lettura del codice a barre) e caricata nello strumento. Un kit contiene l'occorrente per l'esecuzione di 10 test. Lo strumento è modulare, la versione più diffusa può contenere da 1 a 4 moduli per il caricamento di altrettanti campioni; esiste anche una versione con 16 postazioni. I moduli sono indipendenti tra loro, per cui non è necessario caricare i campioni contemporaneamente. In caso di positività, i risultati sono riportati in modo semiquantitativo (*high, medium, low, very low*) in base al valore del C_T (*threshold cycle*). La resistenza alla rifampicina viene refertata come presente o assente. Il tempo complessivo di esecuzione del test è di due ore circa.

Per i dettagli procedurali si rimanda alle istruzioni operative del kit disponibili nella versione su CD.

Tab. 1 - PERFORMANCE DIAGNOSTICA DEL TEST XPERT MTB/RIF SU CAMPIONI RESPIRATORI ED EXTRA-POLMONARI.

Autore (referenza)	N. campioni	Tipo campioni	Coltura positiva	Microscopia positiva	Indeterminati	Gold standard	Specificità (%)	Sensibilità (%)
Helb (30)	171	R	146	93	0	M	89	100
Boehme (8)	1462*	R	741	567	3,7	M + C	89,1	98
Theron (65)	480*	R	141	94	0,2	M + C	80,9	99,1
Marlowe (46)	217	R	130	87	0	M	89,2	100
Hillerman (31)	521	NR	62	6	3,8	M	77,3	98,2
Malbruny (45)	180	R + NR	31	15	0	M	93,5	98,6
Vadway (68)	547	NR	283	145	0,7	M + C	81	99,6
Bowles (10)	89	R	64	40	0	M + C	98,8	92
Ioannidis (36)	109	R + NR	35	16	1,8	M	91,4	93
Teo (64)	162	R + NR	82	49	5,5	M	90	89,5
Miller (47)	112	R + NR	37	28	0	M + C	92	95
Nicol (50)	452	RP	70	27	0	M + C	75,9	98,8
Causse (17)	340	NR	41	3	0	M + C	95	100
Boehme(9)	4062*	R	1033	648	2,0	M + C	83,8	98,9
Moure (48)	108	NR	108	0	1,9	M + C	53,8	100
Tortoli (66)	1.476	NR	238	128	1,1	M + C	81,3	99,8

*N., numero pazienti; R, campioni respiratori; NR, campioni non respiratori; R, prevalenza di campioni respiratori; RP, campioni pediatrici respiratori; M, microbiologia; C, clinica.

Tab. 2 - PERFORMANCE DIAGNOSTICA DI ALCUNI SISTEMI COMMERCIALI SU CAMPIONI EXTRAPOLMONARI.

Autore (referenza)	Test commerciale	N. campioni	Gold standard	Specificità (%)	Sensibilità (%)
O'sullivan (52)	MTD2	164	M + C	77,3	98,5
Laraque (40)	MTD2	682	M + C	89,3	74,5
Ruesch-Gerdes (60)	Probetec ET	396	M + C	81,4	97,5
Causse (17)	Cobas TaqMan	340	M + C	78	98
Piersimoni (55)	Probetec ET	918	M + C	82,7	99,0

M, microbiologia; C, clinica.

Controllo di qualità:

Xpert MTB/RIF è dotato di due controlli interni: SPS (*Sample Processing Control*), che controlla il processo di estrazione del DNA e la presenza di eventuali sostanze inibenti e PCC (*Probe Check Control*), che verifica l'integrità dei probe e degli altri reagenti presenti nella cartuccia. I campioni ini-

biti vengono refertati come *invalid*, mentre i test abortiti escono come *no result*. Controlli preparati a partire da colture di ceppi di riferimento di *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 25177 o 27294) possono essere inseriti random fra i campioni della routine.

11.2.7. ALTRI KIT COMMERCIALI PER LA RICERCA MOLECOLARE DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX

Negli ultimi anni si è assistito a una proliferazione di kit commerciali per la ricerca diretta di MTC mediante amplificazione genica. Di questi, la maggior parte si avvale della RT-PCR (*Real-Time PCR*), ma alcuni impiegano tecniche quali NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), TRC (*Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction*), LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) e altre. Alcuni di essi occupano rilevanti fette di mercato pur in assenza di una legittimazione scientifica, altri sono commercialmente irrilevanti, pur possedendo un rispettabile supporto di pubblicazioni. La trattazione di tali sistemi esula dalle finalità di questa rassegna.

11.3. PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ

Solo i laboratori provvisti delle necessarie dotazioni tecnico-strutturali e di un'adeguata competenza in micobatteriologia dovrebbero eseguire i test di amplificazione per la ricerca di MTC (14, 15). Questi laboratori sono tenuti a partecipare a un programma esterno di qualità per ogni aspetto della diagnostica micobatteriologica, inclusa l'amplificazione (71). Fra i programmi di *proficiency* disponibili in commercio, i seguenti sono in grado di valutare i test di amplificazione per la ricerca diretta di MTC:

- Quality Control for Molecular Diagnostics (QC), Glasgow (UK), <http://www.qcmd.org>, invia 10-12 campioni all'anno recapitati in unica spedizione, con una *deadline* di circa 40 giorni per l'invio delle risposte;
- Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), <http://www.instand-ev.de>, spedisce 10 campioni all'anno recapitati in 2 invii. I tempi di risposta sono piuttosto ristretti (una settimana);
- UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (NEQAS), London (UK), <http://www.ukneqasmicro.org.uk> (distribuito in Italia da Oxoid). Il programma NEQAS prevede l'esecuzione del test di amplificazione diretta su due campioni inviati mediamente 3 volte l'anno. Su tali campioni è possibile eseguire anche il test molecolare di resistenza alla rifampicina e test di genotipizzazione. La *deadline* per l'invio delle risposte è unica ed è di circa 3 mesi.

L'abbonamento ai suddetti programmi fornisce un servizio con le seguenti caratteristiche: a) istruzioni complete per la ricostituzione e preparazione dei campioni che debbono essere trattati come normali campioni clinici, b) valutazione statistica dei risultati con relativo punteggio, c) garanzia dell'anonimato, d) invio di un certificato di partecipazione.

11.4. PRECAUZIONI

Durante l'esecuzione dei test di amplificazione, il flusso di lavoro deve essere di tipo unidirezionale procedendo, dall'area di preparazione dei reagenti, all'area di preparazione dei campioni, alle

aree di amplificazione e post-amplificazione. Idealmente, le aree dovrebbero essere situate in stanze separate dotate di zona filtro e di tutto l'equipaggiamento necessario. L'esecuzione dei test dovrebbe essere affidata a personale adeguatamente addestrato con esperienza in biologia molecolare (14, 15). Per minimizzare il rischio della contaminazione ambientale da ampliconi, si suggerisce di detergere le aree di lavoro con ipoclorito di sodio, sciacquando dopo circa 15 minuti con acqua deionizzata.

11.5. UTILITÀ CLINICA DEI TEST DI AMPLIFICAZIONE

Sebbene la sensibilità dei test di amplificazione sia inferiore a quella dell'esame colturale, la loro importanza clinica è rilevante in quanto, in caso di positività, essi consentono di porre la diagnosi di tubercolosi in tempi estremamente brevi. La rapidità e l'accuratezza della diagnosi influiscono infatti in maniera significativa sulla gestione della malattia tubercolare, permettendo una minore diffusione dell'infezione e una riduzione dei costi associati all'isolamento e al trattamento dei pazienti (29). Inoltre, in caso di esame microscopico positivo, i test di amplificazione permettono di accertare o escludere l'appartenenza del microrganismo al *Mycobacterium tuberculosis* complex. Una metanalisi pubblicata nel 2008 ha esaminato l'accuratezza diagnostica, sui materiali respiratori, dei test di amplificazione del commercio (42). Considerati complessivamente, essi dimostrano una sensibilità media dell'85% e una specificità del 97%. Lo studio conclude che, sebbene molti lavori presentino *bias* metodologici tendenti a sovrastimare la performance diagnostica (22, 61), i test commerciali hanno una sensibilità troppo bassa per poter sostituire la diagnostica convenzionale.

Secondo alcuni Autori (44), i test commerciali di amplificazione dovrebbero essere utilizzati soltanto:

- per escludere la tubercolosi nei pazienti con esame microscopico positivo e sospetta micobatteriosi;
- per confermare la diagnosi di tubercolosi in pazienti con forte sospetto clinico, ma con esame microscopico negativo.

Si tratta di argomentazioni condivisibili da un punto di vista metodologico, anche se la prima sembra eccessivamente restrittiva. Non a caso, il *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, ex NCCLS) suggerisce l'uso sistematico dei test di amplificazione su tutti i casi di prima diagnosi con esame microscopico positivo, mentre l'impiego su campioni respiratori con esame microscopico negativo o su campioni extrapolmonari dovrebbe essere concordato fra microbiologo e clinico (15).

I *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) raccomandano di eseguire il test di amplificazione su almeno un campione respiratorio raccolto da soggetti con segni e sintomi di tubercolosi polmonare per i quali non sia stata posta una diagnosi certa (14).

L'accuratezza diagnostica dei test di amplificazione commerciali è stata approfondita anche in uno studio apparso sul sito dell'*Health Technology Assessment* (HTA) affiliato al *National Health System* (NHS) inglese (<http://www.hta.nhsweb.uk>) (23). Lo studio conferma che i test commerciali forniscono risultati più accurati sui materiali respiratori che su quelli di provenienza extrapolmonare, mentre in confronto ai test *in-house* risultano meno sensibili ma notevolmente più specifici.

Fra i test attualmente in commercio, MTD2 apparirebbe il più sensibile, anche se le differenze

rispetto agli altri test non sono statisticamente significative. La sua specificità è buona anche su alcuni materiali extrapolmonari quali liquor, liquido pleurico, linfonodi e urine, sia pur con sensibilità inferiore a quella riscontrata sui materiali respiratori. Lo studio conclude che:

- sui campioni respiratori con esame microscopico positivo i test di amplificazione diretta vanno impiegati sempre, indipendentemente dal grado di sospetto clinico, allo scopo di differenziare MTC dai micobatteri non tubercolari;
- nei campioni respiratori con esame microscopico negativo, un uso appropriato dei test di amplificazione diretta non può prescindere da un'attenta valutazione del sospetto clinico.

La tabella 3 mostra come il grado di sospetto clinico abbia un peso rilevante sulla probabilità che i test di amplificazione diretta, in pazienti con esame microscopico negativo, siano utili alla diagnosi di tubercolosi polmonare. La tabella è stata ricavata ipotizzando per i test di amplificazione una sensibilità e una specificità, rispettivamente, del 73,4% e del 93,7%. Come si può notare, è necessario un sospetto clinico quanto meno "intermedio" per poter trarre beneficio, in termini di predittività della malattia, da un risultato positivo del test. Nel caso di basso sospetto clinico, invece, la probabilità di malattia, in presenza di un risultato positivo del test, non supera il 50%. Per contro, in presenza di un forte sospetto clinico, la negatività del test non riduce di molto la probabilità di malattia. Va tenuto presente che le probabilità riportate in tabella sono state calcolate presumendo che la sensibilità e la specificità dei test di amplificazione diretta rimangano costanti indipendentemente dall'entità del sospetto clinico. In realtà, poiché la sensibilità tende ad essere più alta quando il sospetto clinico è maggiore, l'utilità clinica dei test di amplificazione diretta è ancora più bassa in caso di basso sospetto clinico.

Tab. 3 - IMPATTO DEI TEST DI AMPLIFICAZIONE DIRETTA (DAT) SULLE PROBABILITÀ DIAGNOSTICHE IN PAZIENTI CON SOSPETTO DI TUBERCOLOSI POLMONARE CON ESAME MICROSCOPICO NEGATIVO (17).

Probabilità di malattia tubercolare (%)			
Pre-test		Post-test	
		sensibile	intermedio
Alta	0,80	0,98	0,53
	0,60	0,95	0,30
	0,40	0,89	0,16
Intermedia	0,30	0,83	0,11
	0,20	0,74	0,07
	0,10	0,56	0,03
Bassa	0,08	0,49	0,02
	0,05	0,38	0,01
	0,03	0,23	0,01

11.6. PROBLEMATICHE CONNESSE ALLE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE COMMERCIALE

Le tecniche di amplificazione per la ricerca di MTC direttamente da campione, pur fornendo un importante contributo alla diagnostica microbiologica della tubercolosi, soffrono di alcune problematiche ancora irrisolte riferibili alla presenza di falsi negativi e falsi positivi (tab. 4) (1).

Tab. 4 - POSSIBILI CAUSE DI FALSI NEGATIVI E DI FALSI POSITIVI

Falsi negativi	Falsi positivi
- Eccessiva diluizione del campione	- Contaminazioni crociate
- Presenza di inibitori	- <i>Gold standard</i> esclusivamente microbiologico
- Insufficiente estrazione del <i>target</i>	- Utilizzo dei test di amplificazione diretta in assenza di un congruo sospetto clinico (come <i>screening</i>)

Per quanto riguarda i falsi negativi le cause possono essere le più varie:

- la distribuzione disomogenea dei micobatteri nel campione;
- la risospensione del *pellet*, al termine della decontaminazione, in volumi superiori a 2 mL con conseguente eccessiva diluizione del campione;
- la presenza di sostanze, la cui natura è ancora largamente sconosciuta, capaci di interagire con la polimerasi bloccando l'amplificazione. È verosimile che le sostanze coinvolte siano diverse dato che l'azione inibente varia a seconda dei sistemi di amplificazione. La corretta preparazione del campione (decontaminazione, neutralizzazione e lavaggio) e la presenza del controllo interno di amplificazione rappresentano i punti chiave per il contenimento e, rispettivamente, l'evidenziazione degli inibitori (33, 35);
- la modalità di estrazione dell'acido nucleico (56, 59). Nei sistemi commerciali, infatti, l'estrazione viene realizzata in maniera grossolana, per lo più tramite sonicazione associata a inattivazione termica. Attualmente sono disponibili in commercio sistemi di estrazione (manuali o automatizzati) che, accanto alle procedure classiche, utilizzano metodiche di cattura degli acidi nucleici tramite fibre di vetro o particelle di silicio (4, 27, 32). Queste metodiche sono molto promettenti, anche se non sono state ancora applicate su larga scala ai kit commerciali. Per l'estrazione del DNA è oggi disponibile anche un supporto solido (GenoCard, Hain) su cui è sufficiente depositare una goccia di campione clinico o di una sospensione batterica; basta poi ritagliare, con un apposito punzone, un dischetto del supporto solido stesso e trasferirlo direttamente nella mix di amplificazione. I campioni depositati sulla GenoCard possono essere facilmente inattivati al calore e quindi spediti senza alcun rischio infettivo.

Per sfruttare al massimo la sensibilità dei sistemi commerciali è necessario ottenere campioni respiratori di buona qualità, testandone anche più di uno nei casi in cui il sospetto clinico di tubercolosi sia elevato (14, 15).

I falsi positivi, invece, sono dovuti essenzialmente alla cross-contaminazione da acidi nucleici amplificati precedentemente. La maggior parte dei kit commerciali contiene sistemi di vario genere che permettono di minimizzare la frequenza delle contaminazioni crociate.

L'interpretazione clinica dei risultati ottenuti con i test di amplificazione può talvolta risultare ardua. I test positivi all'amplificazione e negativi alla coltura vengono, in prima battuta, considerati dei falsi positivi. La risoluzione dei dati discrepanti, fatta adottando un *gold standard* più ampio, che affianchi alla coltura anche il quadro clinico del paziente, permette invece di considerare tali risultati corretti. Talvolta la positività dell'amplificazione non confermata dalla coltura è legata a specie quali *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*, che, sui terreni normali e con i normali tempi di incubazione, possono risultare non evidenziabili. Dato che l'amplificazione degli acidi nucleici, soprattutto del DNA, non distingue fra micobatteri vitali e non vitali, i test di amplificazione non vanno eseguiti nei pazienti in terapia, poiché non forniscono alcun indizio utile a monitorare l'andamento della stessa. Le discrepanze fra risultato dei test di amplificazione diretta e il *gold standard* clinico-microbiologico possono essere minimizzate usando i test commerciali secondo criteri di appropriatezza diagnostica, includendo in essa non solo la limitazione dell'impiego ai soli pazienti con congruo sospetto clinico di tubercolosi (16, 41, 54, 57), ma anche l'esecuzione sui materiali più rappresentativi della sede di lesione, adeguati per qualità, quantità e modalità di raccolta (22, 23, 69).

11.7. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E REFERTAZIONE

Secondo le indicazioni dei CDC (14) è opportuno seguire il seguente algoritmo interpretativo basato sulla disponibilità di tre campioni di espettorato raccolti in giorni diversi:

- in caso di primo campione microscopico positivo con test di amplificazione diretta positivo: diagnosi di tubercolosi certa senza necessità di ulteriori test di conferma;
- in caso di primo campione microscopico positivo e test di amplificazione diretta negativo: valutazione della presenza di inibitori nel campione. In assenza di inibitori testare un secondo campione; se il risultato negativo viene confermato, è verosimile che i micobatteri visti all'esame microscopico siano non tubercolari. In presenza di inibitori, il risultato del test di amplificazione diretta non è interpretabile e l'esame va ripetuto sugli altri campioni;
- in caso di primo campione microscopico-negativo e test di amplificazione diretta positivo: eseguire il test sui restanti campioni. Se almeno un altro campione risulta positivo, la diagnosi di tubercolosi può considerarsi probabile. Se, viceversa, nessun altro campione risulta positivo, il clinico deve basarsi su altri elementi per la diagnosi;
- in caso di primo campione microscopico negativo e test di amplificazione diretta negativo: il clinico deve basarsi su altri elementi per porre la diagnosi. La negatività dei test di amplificazione diretta non esclude la possibilità di tubercolosi polmonare; un paziente i cui campioni risultino negativi all'esame microscopico e al test di amplificazione può essere considerato (anche se non al 100%) non contagioso.

Relativamente all'impiego dei test di amplificazione sui campioni extrapolmonari, i CDC non forniscono alcuna raccomandazione specifica se non quella di utilizzare test prodotti e validati secondo le normative di qualità in vigore negli Stati Uniti.

Secondo quanto riportato dall'ATS e dai CDC (3, 14), il tempo di refertazione dei test di amplificazione diretta non dovrebbe superare le 48 ore dal ricevimento del campione.

11.8. CONCLUSIONI

I test di amplificazione hanno la capacità di individuare *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente nei campioni clinici in poche ore, fornendo, a condizione che vengano impiegati sulla base di un congruo sospetto clinico, risultati dotati di buona sensibilità e di eccellente specificità.

Dal momento che l'amplificazione degli acidi nucleici (particolarmente, ma non solo, del DNA) coinvolge anche i micobatteri non più vitali, tali test commerciali non sono di alcuna utilità nel follow-up del paziente in terapia e sono controindicati nei casi di sospetta recidiva a breve distanza dall'episodio di prima diagnosi (11, 13).

L'uso dei test di amplificazione non deve prescindere in nessun caso dalla contemporanea esecuzione delle metodiche tradizionali (microscopia e coltura) (2, 14).

In base ai dati attualmente disponibili, i test di amplificazione sembrano avere un impatto clinico ed economico scarsamente misurabile (24, 42) e comunque non eccelso. La promessa di un test molecolare capace di rivoluzionare la diagnostica della tubercolosi è pertanto ancora largamente disattesa.

BIBLIOGRAFIA

1. ATS, *Rapid diagnostic test for tuberculosis: what is the appropriate use?*, 1997, *Am J Respir Crit Care Med*; 155:1804-1814.
2. ATS, CDC, *Council of the Infectious Disease Society of America. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children*, 2000, *Am J Respir Crit Care Med*; 161:1376-1395.
3. ATS, CDC, IDSA, *Controlling tuberculosis in the United States*, 2005, *Am J Respir Crit Care Med*; 172:1169-1227.
4. Aldous W.K., Pounder J.I., Cloud J.L., Woods G.L., *Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR*, 2005, *J Clin Microbiol*; 43:2471-2473.
5. Apfalter P., Reischl U., Hammerschlang M.R., *In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results?*, 2005, *J Clin Microbiol*; 43:5835-5841.
6. Bankowski M.J., Anderson S.M., *Real-time nucleic acid amplification in clinical microbiology*, 2004, *Clin Microbiol News*; 26:9-15.
7. Bicmen C., Gunduz A.T., Coskun M., Senol G., Cirak A.K., Ozsoz A., *Molecular detection and identification of Mycobacterium tuberculosis complex and four important nontuberculous mycobacterial species in smear-negative clinical samples by the GenoType Mycobacteria Direct test*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:2874-2878.
8. Boehme C.C., Nabeta P., Hillemann D., Nicol M.P., Shenai S., Krapp F., Allen J., Tahirli R., Blakemore R., Rustomjee R., Milovic A., Jones M., O'Brien S.M., Persing D.H., Ruesch Gerdes S., Gatuzzo E., Rodrigues C., Alland D., Perkin M.D., *Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance*, 2010, *N Engl J Med*; 363:1005-1015.
9. Boehme C.C., Nicol M.P., Nabeta P., Michael J.S., Gotuzzo E., Tahirli R., Gler M.T., Blakemore R., Worodria W., Gray C., Huang L., Caceres T., Mehdiyev R., Raymond L., Whitelaw A., Sagadevan K., Alexander H., Alland D., Perkins M.D., *Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study*, 2011, *Lancet*; 377:1495-1505.
10. Bowles E.C., Frey e B., van Ingen J., Mulder B., Boeree M.J., van Soolingen D., *Xpert MTB/RIF, a novel automated polymerase chain reaction-based tool for the diagnosis of tuberculosis*, 2011, *Int J Tuberc Lung Dis*; 15:988-989.
11. CDC, *Nucleic acid amplification tests for tuberculosis*, 1996, *MMWR*; 45:950-952.
12. CDC, *Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis*, 2000, *JAMA*; 284:826.
13. CDC, *Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis*, 2000, *MMWR*; 49:593-594.
14. CDC, *Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis*, 2009, *MMWR*; 58:7-10.
15. CLSI, *Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline*, 2008, CLSI, Forbes, BA.
16. Catanzaro A., Perry S., Clarridge J.E., Dunbar S., Goodnight-White S., Lo Bue P.A., Peter C., Pfyffer G.E.,

- Sierra M.F., Weber R., Woods G., Mathews G., Jonas V., Smith K., Della Latta P., *The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial*, 2000, *JAMA*; 283:639-645.
17. Causse M., Ruiz P., Gutiérrez Aroca J.B., Casal M., *Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:3065-3067.
 18. Chen X., Yang Q., Kong H., Chen Y., *Real-time PCR and Amplified MTD for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary specimens*, 2012, *Int J Tuberc Lung Dis*; 16:235-239.
 19. Christiansen D.C., Roberts G.D., Patel R., *Mycobacterium celatum, an emerging pathogen and cause of false positive amplified Mycobacterium tuberculosis direct test*, 2004, *Diagn Microbiol Infect Dis*; 49:19-24.
 20. Compton J., *Nucleic acid sequence-based amplification*, 1991, *Nature*; 350:91-92.
 21. Cramer S.O., Matinmehr F., Hillemann D., *Fast and sensitive detection of the Mycobacterium tuberculosis complex by real-time PCR*, 2004, *Clin Microbiol Infect*; 10:418.
 22. Datta M., Smieja M., *Tuberculosis*, in: Loeb M., Smieja M., Smail F. Ed., *Evidence-based infectious diseases*, 2004, BMJ Books, London; 86-101
 23. Dinnes J., Deeks J., Kunst H., Gibson A., Cummins E., Waugh N., Drobniewski F., Lalvani A., *A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection*, 2007, *Health Technol Assess*; 11:1-196.
 24. Dowdy D.W., Maters A., Parrish N., Beyrer C., Dorman S.E., *Cost-effectiveness analysis of the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test as used routinely on smear-positive respiratory specimens*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:948-953.
 25. Drobniewski F.A., Hoffner S., Rüsche-Gerdes S., Skenders G., Thomsen V., WHO Laboratory Strengthening Task Force, *Recommended standards for modern tuberculosis laboratory services in Europe*, *Eur Respir J*; 28:903-909.
 26. Eisenach K.D., Cave M.D., Bates J.H., Crawford J.T., *Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis*, 1990, *Nucleic Acids Res*; 18:188.
 27. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan M.R., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. III, Smith T.F., *Real-time PCR in clinical laboratory: applications for routine laboratory testing*, 2006, *Clin Microbiol Rev*; 19:165-256.
 28. Franco-Alvarez de Luna F., Ruiz P., Gutierrez J., Casal M., *Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for detection of Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples*, 2006, *J Clin Microbiol*; 44:3025-3027.
 29. Greco S., Girardi E., Navarra A., Saltini C., *The current evidence on diagnostic accuracy of commercial based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 2006, *Thorax*; 61:783-790.
 30. Helb D., Jones M., Story E., Boehme C., Wallace E., Ho K., Kop J., Owens M.R., Rodgers R., Banada P., Safi H., Blakemore R., Lan N.T., Jones-Lopez E.C., Levi M., Burday M., Ayakaka I., Mugerwa R.D., McMillan B., Winn-Deen E., Christel L., Dailey P., Perkins M.D., Persing D.H., Alland D., *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology*, 2010, *J Clin Microbiol*; 48: 229-237.
 31. Hillemann D., Rusch-Gerdes S., Boehme C., Richter E., *Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:1202-1205.

32. Honore-Bouakline S., Vincensini J.P., Giacuzzo V., Lagrange P.H., Herrmann J.L., *Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:2323-2329.
33. Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., *Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays*, 2004, *J Clin Microbiol*; 42:1863-1868.
34. Hur M., Moon H.W., Yun Y.M., Kang T.Y., Kim H.S., Kim H.S., Lee K.M., Kang S.H., Lee E.H., *Detection of tuberculosis using artus M. tuberculosis PCR kit and COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis test*, 2011, *Int J Tuberc Lung Dis*; 15:795-798.
35. Ieven M., Goossens H., *Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory*, 1997, *Clin Microbiol Rev*; 10:242-256.
36. Ioannidis P., Papaventis D., Karabela S., Nikolaou S., Panagi M., Raftopoulou E., Konstantinidou E., Marinou I., Kanavaki S., *Cepheid GeneXpert MTB/RIF assay for Mycobacterium tuberculosis detection and rifampin resistance identification in patients with substantial clinical indications of tuberculosis and smear-negative microscopy results*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:3068-3070.
37. Kim J.H., Kim Y.J., Ki C.S., Kim J.Y., Lee N.Y., *Evaluation of Cobas TaqMan MTB PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:173-176.
38. Kiraz, N., Saglik I., Kiremitci A., Kasifoglu N., Akgun Y., *Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex obtained from sputum samples*, 2010, *J Med Microbiol*; 59:930-934.
39. Kwok D.Y., Davis G.R., Whitfield K.M., Chappelle H.L., Di Michele L.J., Gingeras T.R., *Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format*, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA*; 86:1173-1177.
40. Laraque F., Griggs A., Slopen M., Munsiff S.S., *Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting*, 2009, *Clin Infect Dis*; 49:46-54.
41. Lim T.K., Mukhopadhyay A., Gough A., Khoo K.L., Khoo S.M., Lee K.H., Kumarasinghe G., *Role of clinical judgment in the application of a nucleic acid amplification test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 2007, *Chest*; 124:902-908.
42. Ling D.I., Flores L.L., Riley L.W., Pai M., *Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression*, 2008, *PLoS ONE*; 3:e1536.
43. Little M.C., Andrews J., Moore R., Bustos S., Jones L., Embres C., Durmowicz G., Harris J., Berger D., Yanson K., Rostkowski C., Yursis D., Price J., Fort T., Walters A., Collins M., Llorin O., Wood J., Failing F., O'Keefe C., Scrivens B., Pope B., Hansen T., Marino K., Williams K., Boenisch M., *Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTec ET*, 1999, *Biol Chem*; 45:777-784.
44. Long R., *Smear-negative pulmonary tuberculosis in industrialized countries*, 2001, *Chest*; 120:330-334.
45. Malbruny B., Le Marrec G., Couraheux K., Leclercq R., Cattoir V., *Rapid and efficient detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory samples*, 2011, *Int J Tuberc Lung Dis*; 15:553-555.
46. Marlowe E.M., Novak-Weekley S.M., Cumpio J., Sharp S.E., Momeny M.A., Babst A., Carison J.S., Kawamura

- M., Pandori M., *Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:1621-1623.
47. Miller M.B., Popowitch E.B., Backlund M.G., Ager E.P., *Performance of Xpert MTB/RIF RUO assay and IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis detection in clinical samples*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:3458-3462.
48. Moure R., Munoz L., Torres M., Santin M., Martin R., Alcaide F., *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:1137-1139.
49. Neonakis I.K., Gitti Z., Beritaki S., Petinaki E., Baritaki M., Spandidos D.A., *Comparative evaluation of GenoType mycobacteria direct assay with Gen-Probe Mycobacterium tuberculosis amplified direct test and GenoType MTB-DRplus for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples*, 2009, *J Clin Microbiol*; 47:2601-2603.
50. Nicol M.P., Workman L., Isaacs W., Munro J., Black F., Eley B., Boehme C.C., Zemanay W., Zar H.J., *Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study*, 2011, *Lancet Infect Dis*; 11:819-824.
51. Noordhoek G.T., van Embden J.D.A., Kolk A.H.J., *Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories*, 1996, *J Clin Microbiol*; 34:2522-2525.
52. O'Sullivan C., Miller D.R., Schneider P.S., Roberts G.D., *Evaluation of Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test by using respiratory and nonrespiratory specimens in a tertiary care center laboratory*, 2002, *J Clin Microbiol*; 40:1723-1727.
53. Parrish N.M., Carroll K.C., *Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:72-776.
54. Perry S., Catanzaro A., *Use of clinical risk assessment in evaluation of nucleic acid amplification tests for HIV/ tuberculosis*, 2000, *Int J Tuberc Lung Dis*; 4:S34-S40.
55. Piersimoni C., Bornigia S., Gherardi G., *Performance of a commercial nucleic acid amplification test with extrapulmonary specimens for the diagnosis of tuberculosis*, 2012, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31:287-293.
56. Piersimoni C., Scarparo C., *Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:5355-5365.
57. Piersimoni C., Nista D., Zallocco D., Galassi M., Cimarelli M.E., Tubaldi A., *Clinical suspicion as a primary guidance to use commercial amplification tests for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 2005, *Diagn Microbiol Infect Dis*; 53:195-200.
58. Raja S., Ching G., Xi L., Hughes S.J., Chang R., Wong W., McMillan W., Gooding W.E., McCarty K.S. Jr., Chestney M., Luketich J.D., Godfrey T.E., *Technology for automated, rapid, and quantitative PCR or reverse transcription-PCR clinical testing*, 2005, *Clin Chem*; 51:882-890.
59. Roberts G.D., Hall L., Wolk D.M., *Mycobacteria*, in: Truant A.L. Ed., *Manual of commercial methods in clinical microbiology*, 2002, ASM, Washington DC; 256-273.
60. Rüsç-Gerdes S., Richter E., *Clinical evaluation of the semiautomated BDProbeTec ET for the detection of*

- Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens, 2004, *Diagn Microbiol Infect Dis*; 48:265-270.
61. Sarmiento O.L., Weigle K.A., Alexander J., Weber D.J., Ammerman A.S., *Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:3233-3240.
 62. Seagar A.L., Prendergast C., Emmanuel F.X., Rayner A., Thomson S., Laurensen I.F., *Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for the simultaneous detection of the Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in smear-positive respiratory specimens*, 2008, *J Med Microbiol*; 57:605-611.
 63. Syre H., Myneedu V.P., Arora V.K., Grewal H.M.S., *Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid amplification tests, the Gen-Probe Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct test and the GenoType Mycobacteria Direct test*, 2009, *J Clin Microbiol*; 47:3635-3639.
 64. Teo J., Jureen R., Chiang D., Chan D., Lin R., *Comparison of two nucleic acid amplification assays, the Xpert MTB/RIF and the amplified Mycobacterium tuberculosis direct assay, for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:3659-3662.
 65. Theron G., Peter J., van Zyl-Smit R., Mishra H., Streicher E., Murray S., Dawson R., Whitelaw A., Hoelscher M., Sharma S., Pai M., Warren R., Dheda K., *Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting*, 2011, *Am J Respir Crit Care Med*; 184:132-140.
 66. Tortoli E., Russo C., Piersimoni C., Mazzola E., Dal Monte P., Pascarella M., Borroni E., Mondo A., Piana F., Scarparo C., Coltella L., Lombardi G., Cirillo D.M., *Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis*, 2012, *Eur Respir J*; 40:442-447.
 67. Tortoli E., Urbano P., Marcelli F., Simonetti M.T., Cirillo D.M., *Is real-time PCR better than conventional PCR for Mycobacterium tuberculosis complex detection in clinical samples?*, 50:2810-2813.
 68. Vadwai V., Boehme C., Nabeta P., Shetty A., Alland D., Rodrigues C., *Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis?*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:540-2545.
 69. Van den Wijngaert S., Dediste A., van Laethem Y., Gerard M., Vandenberg O., Zissis G., *Critical use of nucleic acid amplification techniques to test for Mycobacterium tuberculosis in respiratory tract samples*, 2004, *J Clin Microbiol*; 42:837-838.
 70. WHO, *Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Technical and operational 'How-to'. Practical considerations*, 2011, Geneva, WHO/HTM/TB/2011.2.
 71. Yang Y.C., Lu P.L., Huang S.C., Jenh Y.S., Jou R., Chang T.C., *Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for detection of Mycobacterium tuberculosis*, 2010, *J Clin Microbiol*; 49:797-801.

Capitolo 12

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLA TUBERCOLOSI

**Daniela Maria Cirillo,
Paolo Miotto,
Emanuele Borroni**

12. EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELLA TUBERCOLOSI

L'epidemiologia della tubercolosi può essere studiata, oltre che con le indagini epidemiologiche classiche basate sul *contact tracing*, anche con tecniche di biologia molecolare che permettono di differenziare genotipicamente i vari ceppi appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex (3, 15, 16, 21, 57). L'impiego delle tecniche di tipizzazione molecolare ha permesso di approfondire le conoscenze relative alle dinamiche di trasmissione della malattia e di identificare le fonti di contagio e i focolai epidemici.

Il concetto di *cluster* è alla base di tutte le tecniche di genotipizzazione a fini epidemiologici. Si definisce “*cluster*” un insieme di ceppi che risultano geneticamente identici nella regione presa in esame. Dato che le singole tecniche molecolari analizzano regioni con diverso grado di polimorfismo, i *cluster* definiti da ciascuna di esse comprenderanno ceppi epidemiologicamente correlati in maniera più o meno stretta (51). La tecnica ideale dovrebbe essere in grado di rilevare come identici tutti, e soltanto, i ceppi isolati da pazienti infettati da un singolo caso indice (1, 51, 52). Perché i *cluster* acquisiscano significato epidemiologico è necessaria un'accurata valutazione, protratta per un lungo periodo di tempo, di un ampio numero di casi di tubercolosi nella popolazione in esame. Infatti, se lo studio viene eseguito su un numero limitato di ceppi e non su tutti, si possono perdere alcuni casi, mentre, se l'indagine viene condotta per un breve periodo di tempo, non è possibile individuare i casi in cui il passaggio da infezione latente a malattia non è ancora avvenuto (27).

La rapida identificazione di un episodio epidemico di tubercolosi permette la tempestiva attuazione di adeguate misure di controllo e il rapido inizio di una corretta terapia antitubercolare (4, 46, 56). La tipizzazione molecolare ha permesso anche di approfondire le conoscenze relative alle modalità di trasmissione dell'infezione tubercolare in gruppi ad aumentato rischio di malattia, come i pazienti immunodepressi (36, 37), e di differenziare, nei casi di recidiva, le reinfezioni esogene dalle riattivazioni endogene (19, 22, 58).

Oltre alla finalità epidemiologica, le indagini di genotipizzazione presentano anche utilità clinica, in quanto permettono di individuare possibili casi di cross-contaminazione di laboratorio e quindi di evitare che referti falsamente positivi abbiano come conseguenza il trattamento, con terapie non prive di effetti collaterali, di soggetti che, non essendo affetti da tubercolosi, non ne trarranno alcun beneficio (11, 25, 41, 42).

12.1. PRINCIPALI METODI DI GENOTIPIZZAZIONE

12.1.1. RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM DELLA SEQUENZA DI INSERZIONE IS6110 (RFLP)

La metodica si basa sull'analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti di DNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) ottenuto per digestione enzimatica a livello della sequenza di inserzione IS6110 (57). Il polimorfismo è determinato dal numero e dalla posizione degli elementi IS6110 presenti nel genoma.

IS6110 è una sequenza di 1361 basi in grado di duplicarsi e di spostarsi all'interno del genoma delle specie appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex; nel caso di *Mycobacterium tuberculosis* è possibile ritrovarne fino a 25 copie, anche se nella grande maggioranza dei ceppi il numero è compreso fra 5 e 20 (55, 57).

Il pattern degli elementi IS6110 è caratterizzato da una certa stabilità; in media circa la metà dei ceppi presenta un lieve rimaneggiamento ogni 3-4 anni (47, 57). Si tratta quindi di un processo sufficientemente rapido da permettere la distinzione di isolati non correlati e, allo stesso tempo, sufficientemente lento da far sì che ceppi relativi allo stesso focolaio epidemico risultino identici (49, 57).

La tecnica consiste nel taglio del DNA purificato del ceppo in esame mediante digestione enzimatica operata dall'enzima *PvuII* che riconosce un sito di restrizione presente, una sola volta, all'interno dell'elemento IS6110. Dopo separazione elettroforetica su gel di agarosio, i frammenti vengono trasferiti su membrana (*Southern Blot*), dove quelli contenenti il maggiore dei due frammenti in cui è stato diviso IS6110 vengono riconosciuti mediante ibridizzazione con una sonda marcata lunga 868 pb. Si genera in questo modo un pattern di bande il cui numero corrisponde a quello degli elementi IS6110 e la cui posizione sul gel dipende dalla lunghezza dei singoli prodotti di digestione e quindi dalla dislocazione degli elementi IS6110 all'interno del genoma del ceppo in esame (fig. 12.1).

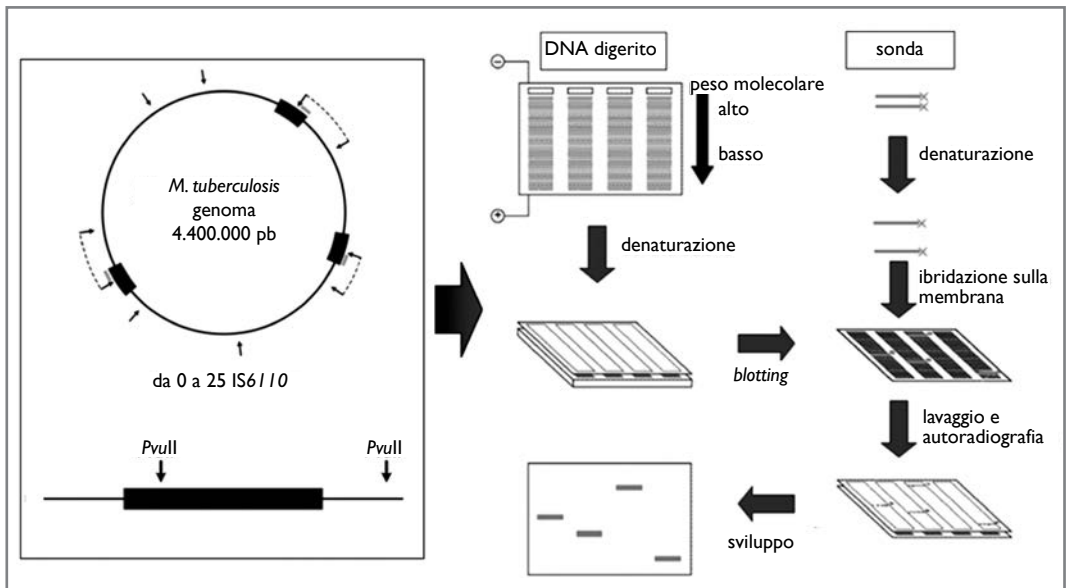


Fig. 12.1 - RFLP di IS6110.

Il potere discriminante e la riproducibilità dell'RFLP sono talmente elevati che gli isolati che hanno pattern differenti provengono sicuramente da pazienti epidemiologicamente non correlati, mentre gli isolati di soggetti infettati dallo stesso caso indice hanno profili identici o tutt'al più differiscono per una sola banda. La tecnica non dà invece risultati epidemiologicamente utili con i

ceppi che hanno un numero di elementi *IS6110* inferiore a 6, dato che il polimorfismo è, in questi casi, limitato (48, 57). Per tale motivo, questa metodica non discrimina in modo efficiente i ceppi di *Mycobacterium bovis*, che sono tipicamente caratterizzati da un basso numero di sequenze *IS6110*.

La genotipizzazione basata sull'elemento *IS6110* è una tecnica complessa che richiede grandi quantità di DNA ottenibili solo da colture rigogliose. Essa si presta quindi poco ad applicazioni cliniche, ambito in cui la rapidità diagnostica è di cruciale importanza (7, 57). È inoltre una metodica costosa che richiede, per una corretta interpretazione, l'utilizzo di software sofisticati e che dovrebbe quindi essere eseguita solo in Strutture di Riferimento ben equipaggiate e in grado di operare in presenza di adeguate misure di sicurezza.

12.1.1.1. PROTOCOLLO RFLP DI *IS6110*

a) Estrazione del DNA:

Esistono vari protocolli per l'isolamento del DNA genomico ad alto peso molecolare. Viene qui riportato quello più utilizzato a livello internazionale:

- risospendere almeno 10-15 colonie cresciute su terreno solido, in 400 μL di tampone TE 1x e inattivare la sospensione a 80 °C per 20 minuti (operazione da eseguire in un laboratorio con livello di biosicurezza III);
- lasciar raffreddare fino a temperatura ambiente, nel frattempo riscaldare a 65 °C una soluzione di cetil-trimetilammonio bromuro (CTAB)/NaCl;
- aggiungere 50 μL di lisozima (10 mg/mL), agitare con vortex e incubare in lenta agitazione a 37 °C per almeno un'ora (l'incubazione può essere estesa anche a tutta la notte);
- aggiungere 75 μL di una soluzione (preparata in precedenza) di SDS (sodio dodecilsolfato) 10%/proteasi K (10 mg/mL);
- incubare a 65 °C per 10-15 minuti;
- aggiungere 100 μL di NaCl 5M per favorire la precipitazione del DNA e 100 μL di soluzione CTAB/NaCl (precedentemente riscaldata), quindi agitare fino a quando la soluzione assume un aspetto lattiginoso;
- incubare a 65 °C per 10 minuti;
- aggiungere, sotto cappa chimica, 750 μL di una miscela di cloroformio/alcol isoamilico (24:1) e agitare per almeno 10 secondi;
- centrifugare a 11.000 g per 8 minuti;
- sotto cappa chimica, trasferire la fase acquosa (supernatante trasparente) in un tubo Eppendorf pulito;
- aggiungere isopropanolo al supernatante in rapporto di 0,6 a 1 (450 μL circa) e miscelare per inversione;
- tenere i tubi a -20 °C per almeno 30 minuti;
- centrifugare a 11.000 g per 15 minuti;
- eliminare il supernatante e lavare il *pellet* con 1000 μL di etanolo al 70% (raffreddato a -20 °C);
- centrifugare a 11.000 g per 5 minuti a 4 °C;
- scartare il supernatante e far evaporare l'etanolo in una *speed-vac* per 15 minuti, sotto cappa chimica;
- risospendere il *pellet* di DNA in 30 μL di TE 1x;

- stimare la concentrazione del DNA caricando 2 μ L di estratto + 2 μ L di *loading buffer* su gel di agarosio allo 0,8% ed eseguendo una corsa elettroforetica (90V per 20 minuti).

b) Digestione del DNA:

- sottoporre a restrizione enzimatica l'equivalente di 2 μ g di DNA con 30 μ L di una soluzione acquosa contenente 25-30 unità di enzima *PvuII*;
- incubare a 37 °C *overnight* o per non meno di un'ora;
- caricare su gel di agarosio 0,8% in TBE 1x ed eseguire una corsa elettroforetica (120V per 20 minuti), per verificare l'avvenuta digestione e per quantificare il DNA da caricare nel *Southern blot* (una minore intensità delle bande ad alto peso molecolare rispetto a quelle a basso peso molecolare è indice di avvenuta restrizione);
- in caso di digestione incompleta o assente:
 - dializzare il campione depositando il DNA su un filtro Millipore (pori da 0,05 μ m) galleggianti sulla superficie del tampone di dialisi e lasciando a contatto per 20 minuti;
 - recuperare il DNA e ripetere digestione e verifica elettroforetica.

c) Preparazione della sonda IS6110 a partire da *M. tuberculosis* MT14323:

- amplificazione:
 - estrarre il DNA con fenolo/cloroformio ed amplificare un frammento di 868 pb, corrispondente ai nucleotidi da 462 a 1330 della sequenza IS6110, usando i *primer*:
G1: 5'-CTGACCGAGCTGGGTGTGCC-3';
G2: 5'-TCTGATCTGAGACCTCAGCC-3';
 - porre in ogni tubo da PCR 40 μ L di *mix* (tab. 1) e 10 μ L di estratto di MT14323 diluito 1/100, quindi amplificare seguendo il protocollo riportato in tabella 2;
 - caricare 1 μ L di prodotto di PCR su gel di agarosio 0,8% ed eseguire l'elettroforesi (90V per 20 minuti) per verificare l'avvenuta amplificazione;
- isolamento del frammento di agarosio contenente l'amplificato:
 - preparare un gel di agarosio LMP (*low melting point*) 1%;
 - caricare lo standard di peso molecolare (scala con intervalli di 100 pb) nell'ultimo pozzetto e gli amplificati di MT14323 nei pozzetti centrali (500 μ L di amplificato + 55 μ L di *loading buffer*)
 - effettuare la corsa elettroforetica a 100V per 30-90 minuti (monitorando la migrazione della banda da 800 pb);
 - identificare, nelle corsie corrispondenti ai campioni, la banda di 800 pb circa, che verrà utilizzata come sonda e ritagliare la porzione di gel che la contiene, avendo cura di prelevare la minor quantità possibile di agarosio;
 - porre il ritaglio di agarosio in una Eppendorf e determinare il peso del gel;
- purificazione della sonda utilizzando il sistema commerciale *Qiaquick Extraction Kit* (Qiagen):
 - aggiungere *QG buffer* all'agarosio in rapporto di 3 a 1 (ad esempio 300 μ L per 100 mg di agarosio);
 - incubare a 50 °C per 10 minuti, miscelando delicatamente ogni tre minuti (il gel deve dissolversi completamente);
 - aggiungere un volume di isopropanolo e miscelare.

- porre una colonna Qiaquick su un tubo da 2 mL e purificare per filtrazione il DNA estratto dal frammento di gel (centrifugazione a 3.000 rpm per 30 secondi);
- scartare il filtrato (contenuto del tubo da 2 mL), porre 0,5 mL di QG *buffer* nella colonna e centrifugare a 13.000 rpm per 30 secondi;
- lavare la colonna con 0,75 mL di PE *buffer* e centrifugare a 13.000 rpm per 1 minuto;
- scartare il filtrato e centrifugare nuovamente la colonna;
- porre la colonna in un tubo Eppendorf da 1,5 mL ed eluire il DNA con 50 μ L di acqua fornita col kit ECL.
- stima della concentrazione della sonda:
 - sottoporre il purificato a elettroforesi su gel di agarosio 0,8% in TBE 1x (90V per 30 minuti), caricando:
 - corsia 1: 10 μ L di λ marker *Pst*I + 2 μ L di *loading buffer*;
 - corsia 2: 1 μ L della sonda da quantificare + 10 μ L di H₂O + 2 μ L di *loading buffer*;
 - corsia 3: 1 μ L di λ marker *Hind*III (=10 ng) + 10 μ L di H₂O + 2 μ L di *loading buffer*;
 - corsia 4: 5 μ L di λ marker *Hind*III (=50 ng) + 10 μ L di H₂O + 2 μ L di *loading buffer*;
 - corsia 5: 10 μ L di λ marker *Hind*III (=100 ng) + 2 μ L di *loading buffer*;
 - stimare la concentrazione in base agli standard; la concentrazione da utilizzare dovrà essere pari a 1 ng/cm².

Tab. 1 - PREPARAZIONE DELLA MIX (PER 10 AMPLIFICAZIONI).

Reagenti	Quantità (μ L)	Concentrazione finale (μ L)
H ₂ O	235	–
Taq buffer 10x	50	1x
DMSO	50	10%
MgCl ₂ 25 mM	30	1,5 μ M
dNTPs (10 mM)	10	200 μ M ciascuno
G1 50 μ M	10	1 μ M
G2 50 μ M	10	1 μ M
Taq 5U/ μ L	5	2,5 U

Tab. 2 - CICLI DI AMPLIFICAZIONE.

Step	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Denaturazione iniziale	94 °C	6 min	1
Denaturazione	94 °C	1 min	35
Appaiamento <i>primer</i>	55 °C	1 min	
Allungamento	72 °C	2 min	
Allungamento finale	72 °C	10 min	1

d) Elettroforesi:

- preparazione del *marker* λ PstI:
 - digerire 100 μ L di λ DNA con λ PstI in un volume finale di 250 μ L;
 - verificare la digestione con elettroforesi su gel di agarosio;
 - aggiungere 75 μ L di soluzione di blu bromofenolo e 175 μ L di tampone TE a pH 8;
- caricare l'equivalente di 2 μ g di DNA digerito + 2 μ L di *loading buffer*, su gel di agarosio 1% in TBE 1x contenente etidio bromuro;
- caricare i campioni lasciando libero il primo e l'ultimo pozzetto;
- caricare 10 μ L di marcatore di peso molecolare λ PstI nel primo pozzetto, per monitorare la migrazione (standard esterno);
- ogni 5 pozzetti, caricare lo standard interno di peso molecolare costituito dal DNA del ceppo *M. tuberculosis* MT 14323 digerito con *Pvu*II;
- eseguire la corsa elettroforetica, dapprima a 90V per 10 minuti (fino alla fuoriuscita del DNA dai pozzetti) e successivamente a 40V *overnight*;
- il giorno seguente, arrestare l'elettroforesi quando la banda a più elevato peso molecolare dello standard esterno si trova a circa 2 cm dai pozzetti;
- fotografare il gel.

e) Trattamento dei gel:

- depurinazione:
 - trattare il gel con una soluzione di HCl 0,25M (13 mL di HCl in 500 mL di H₂O) per 10 minuti, per ottenere la depurinazione che, rompendo le molecole ad alto peso molecolare, facilita il trasferimento del DNA su membrana. Un trattamento prolungato può portare a un'eccessiva idrolisi del DNA e generare frammenti troppo piccoli, incapaci di aderire correttamente alla membrana;
 - risciacquare il gel con acqua distillata per 1-2 minuti;
- denaturazione del DNA:
 - tenere il gel a contatto con la soluzione denaturante (NaCl 1,5M/NaOH 0,5M) per 20 minuti in agitazione, ripetere tale passaggio per due volte;
 - risciacquare il gel con acqua distillata per 1-2 minuti;
- neutralizzazione:
 - tenere il gel a contatto con la soluzione neutralizzante (NaCl 1,5M/Tris 1M a pH 8) per 20 minuti in agitazione, ripetere tale passaggio per due volte.

f) Trasferimento degli acidi nucleici alla membrana (*Southern blot*):

- *vacuum transfer*:
 - ritagliare un pezzo di membrana Hybond N+ e un pezzo di Whatman *paper* delle dimensioni del gel e impregarle con acqua;
 - posizionare, sul supporto poroso dell'apparato di *blotting*, la carta Whatman e, sopra a questa, la membrana Hybond N+, facendo attenzione a non formare bolle d'aria;
 - posizionare il box di plastica sulla membrana;
 - porre il gel all'interno del box;
 - riempire i pozzetti con agarosio 1%, accertandosi che non si formino bolle d'aria;

- ricoprire il gel con tampone NaCl/citrato di sodio (SSC) 20x;
 - chiudere il coperchio dell'apparato di *blotting* e bloccarlo con le clip;
 - collegare la pompa per il vuoto (45-60 mbar per 60-90 minuti);
 - dopo il trasferimento:
 - prima di rimuovere il gel, segnare sulla membrana, con una matita, la posizione del primo e dell'ultimo pozzetto;
 - rimuovere il gel e la membrana;
 - avvolgere la membrana in un involucro Saran;
 - fissare il DNA alla membrana esponendo la faccia contenente il DNA a luce UV (365 nm per 4 minuti o 254 nm per un minuto);
 - verificare l'efficienza del trasferimento esaminando il gel al transilluminatore per verificare che non vi siano rimaste tracce di DNA;
 - la membrana fissata può essere conservata a 4 °C.
- g) Ibridizzazione e identificazione:
- preibridizzazione:
 - preparazione del *buffer* di ibridizzazione (200 mL) (kit Amersham):
 - scaldare a 65 °C il *buffer* di ibridizzazione contenuto nel kit;
 - preparare una soluzione di NaCl 0,5M;
 - aggiungere 10 g di agente bloccante;
 - miscelare per un'ora a 65 °C (usando un agitatore magnetico) avendo cura di prevenire la formazione di agglomerati;
 - conservare, in aliquote da 30 mL, a -20 °C, per un massimo di tre mesi;
 - porre la membrana in una provetta di ibridizzazione in modo che la faccia col DNA non sia a contatto con la parete del tubo;
 - preibridizzare la membrana a 42 °C per 45-60 minuti mediante rotazione, in presenza di *buffer* di ibridizzazione (volume di *buffer* richiesto: 0,125 mL/cm² di membrana);
 - marcatura della sonda (usando il kit ECL, GE Healthcare). La concentrazione finale della sonda deve essere 1 ng/cm²:
 - portare la sonda a una concentrazione di 10 ng/mL (in 50 mL) con l'acqua fornita dal kit ECL;
 - scaldare a 100 °C per 5 minuti, quindi mantenere a 0 °C per 5 minuti;
 - aggiungere 50 µL di *labelling reagent*;
 - aggiungere 50 µL di glutaraldeide;
 - incubare a 37 °C per 10 minuti;
 - conservare in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo. La sonda marcata può essere conservata in glicerolo al 50%, a -20 °C, per sei mesi;
 - ibridizzazione:
 - trasferire 36 µL di sonda marcata in una provetta pulita, aggiungere il *buffer* di ibridizzazione e miscelare per rotazione;
 - trasferire il tutto nella provetta di ibridizzazione contenente la membrana;
 - incubare a 42 °C *overnight* in rotazione;

- lavaggi:
 - il giorno successivo, decantare il liquido;
 - eseguire due cicli di lavaggio della membrana (di 10 minuti ciascuno) con il *buffer* di lavaggio 1 a 55 °C in agitazione energica;
 - lavare la membrana con *buffer* di lavaggio 2 a temperatura ambiente in agitazione (due cicli di 5 minuti ciascuno);
- rivelazione (usando il kit ECL):
 - preparare la *detection mixture* (da conservare al buio) miscelando 20 µL di *detection reagent* 1 con 20 µL di *detection reagent* 2 in una provetta;
 - asciugare la membrana su Whatman *paper*;
 - porre la membrana in un contenitore con il lato del DNA verso l'alto;
 - ricoprire la membrana con la *detection mixture* e agitare manualmente per un minuto;
 - rimuovere la membrana ed eliminare l'eccesso di reagente assorbendolo sul foglio di Whatman *paper*;
 - porre la membrana in una cassetta per autoradiografia e coprire con un involucre Saran;
 - porre una pellicola (Hyperfilm) sulla membrana, chiudere la cassetta e lasciare riposare per un minuto;
 - sviluppare la pellicola e stimare il tempo di esposizione ottimale per una seconda esposizione;
 - impressionare una seconda pellicola per il tempo stimato.

12.1.1.2. INTERPRETAZIONE DEL PROFILO

Le immagini contenenti i profili di bande possono essere caricate su un software (Bionumerics, InfoQuest) in grado di analizzarle e archivarle. L'analisi può essere condotta anche visivamente (fig. 12.2); si considerano identici due profili che hanno lo stesso numero di bande e la stessa localizzazione sul tracciato. Due profili che differiscono per una sola banda hanno un'elevata probabilità di appartenere allo stesso *cluster*: in un ceppo potrebbe infatti essersi verificata la duplicazione di un elemento IS6110 o lo spostamento dello stesso in altra posizione.

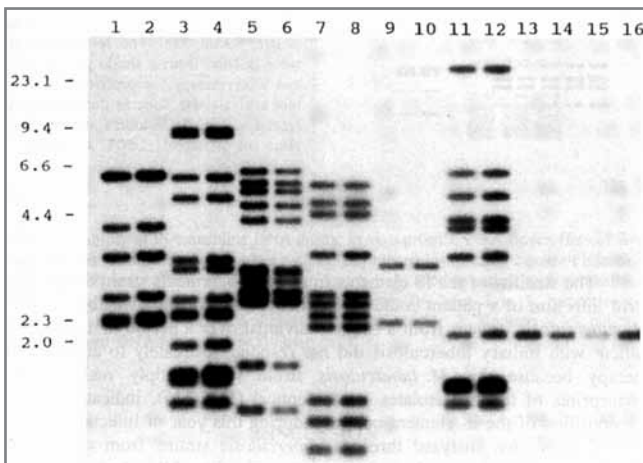


Fig. 12.2 - PROFILI RFLP DI *M. TUBERCULOSIS* (1-12) E *M. BOVIS* (13-16).

12.1.2. MYCOBACTERIAL INTERSPERSED REPETITIVE UNITS-VARIABLE NUMBER TANDEM REPEAT (MIRU-VNTR)

Il genoma di *Mycobacterium tuberculosis* complex contiene 41 *loci* genici con sequenze ripetute (*tandem repeat*) di lunghezza variabile da 40 a 100 pb. Tali *loci*, chiamati *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU), contengono un numero variabile di ripetizioni in tandem, tutte uguali tra loro o leggermente differenti nella lunghezza e nella sequenza (53, 60). L'estrema variabilità di alcuni dei *loci* suddetti, (54) legata al diverso numero di sequenze ripetute (VNTR, *Variable Number Tandem Repeat*) contenute, determina un polimorfismo utile ai fini di genotipizzazione.

La tecnica MIRU-VNTR basata inizialmente sullo studio di 12 *loci* è stata successivamente allargata a 15. La variante attualmente più utilizzata, specialmente in campo clinico, valuta 24 *loci*; poiché ognuno di essi può avere vari alleli, le possibili combinazioni alleliche sono circa 20 milioni. Tale variabilità rende il potere discriminatorio della genotipizzazione MIRU paragonabile, o addirittura superiore, a quello della RFLP di IS6110 (34, 51, 53, 60). La tecnica MIRU-VNTR 24 viene anche indicata come MIRU-VNTR 15+9, dove 15 sono i *loci* altamente discriminatori e 9 quelli con valenza prevalentemente filogenetica (44, 62).

La tecnica MIRU-VNTR 24 si basa sull'amplificazione, mediante PCR, di 24 *loci*; i prodotti ottenuti vengono quindi caratterizzati attraverso elettroforesi su gel, oppure mediante sequenziamento (8, 53, 54). Attualmente sono disponibili sia una metodica manuale, che utilizza PCR, singole o *multiplex*, e successiva analisi su gel, sia una metodica automatizzata, disponibile anche come kit commerciale, che utilizza PCR *triplex* o *quadruplex* e sequenziamento. Nella tabella 3 sono riportate le principali caratteristiche delle due tecniche.

Tab. 3 - PRINCIPALI CARATTERISTICHE DELLE METODICHE "MANUALE" E "AUTOMATIZZATA" MIRU-VNTR 24.

	Metodo manuale	Metodo automatizzato
Accuratezza dei risultati	Elevata	Elevata
Modalità di interpretazione dei risultati	Analisi del gel, <i>locus per locus</i> , per valutare il peso molecolare delle bande attraverso il confronto con la scala dei marker. Conversione dei pesi molecolari in numero di <i>tandem repeat</i> utilizzando una tabella di decodifica	Il sequenziatore, una volta calibrato, produce automaticamente dei file di report, che vengono analizzati con appositi software (GeneMapper o GeneMarker)
Esecuzione	Complessa	Relativamente semplice, in particolare se si usano piastre a 96 pozzetti
Primer	Non marcati	Legati a un fluoroforo
Costo	Basso	Elevato, sia per la strumentazione che per i reagenti
Utilizzo	Per bassi carichi di lavoro o per la verifica di singoli <i>loci</i> dubbi	Per carichi di lavoro medio-alti

Il DNA di partenza può essere ottenuto da colture, liquide o solide, positive per *Mycobacterium tuberculosis* complex o, in alcuni casi, anche direttamente da materiale clinico.

I principali vantaggi della genotipizzazione MIRU sono la semplicità e la rapidità di esecuzione, dovuta all'utilizzo dell'amplificazione, nonché l'accuratezza e la riproducibilità dei risultati (34, 53, 54, 60).

12.1.2.1. PROTOCOLLO MIRU-VNTR 24

Metodo manuale:

a) Preparazione dei campioni:

- mettere 100 µL di tampone TE o acqua sterile in una provetta da 2 mL e sospenderci 4-5 colonie;
- incubare per 30 minuti a 95 °C (inattivazione/estrazione);
- centrifugare a 13.000 rpm e raccogliere il surnatante.

b) Amplificazione:

la concentrazione del cloruro di magnesio (MgCl₂) è diversa a seconda del *locus* MIRU testato (tab. 4):

- preparare la *mix* in una stanza dedicata (i *primer* da utilizzare sono riportati in tabella 5);
- dispensare 45 µL della *mix* in tubi singoli o nei pozzetti di una piastra;
- in uno spazio dedicato aggiungere a ogni soluzione di reazione 5 µL di DNA diluito 1:10;
- aggiungere un controllo negativo e un controllo positivo con profilo VNTR-24 noto (H37Rv o BCG Pasteur);
- eseguire l'amplificazione seguendo lo schema riportato in tabella 6.

c) Elettroforesi:

- preparazione del gel di agarosio Nusieve al 3%;
 - aggiungere 4,5 g di agarosio a 150 mL di TBE buffer 1x, freddo;
 - scaldare in microonde fino a disciogliere completamente l'agarosio;
- aggiungere a ogni amplificato 10 µL di *loading buffer*, mescolare e caricarne 10 µL nel gel, in modo che gli amplificati relativi allo stesso *locus* MIRU siano adiacenti;
- caricare il gel con circa 10 µL (la quantità dipende dalla concentrazione dei pesi molecolari usati) di marcatore di peso molecolare (scala a intervalli di 100 pb) nei pozzetti laterali e tra le serie relative ai vari *loci* MIRU;
- eseguire l'elettroforesi per 5 ore a 100V;
- osservare il gel al transilluminatore e fotografare (fig. 12.3).

d) Interpretazione:

- determinare il peso molecolare di ciascun amplificato per confronto con le bande del marker e con quelle degli amplificati del ceppo usato come controllo;
- le dimensioni (in paia di basi) di ciascun amplificato permettono di determinare il numero di ripetizioni tandem presenti in ogni singolo *locus* (tab. 7);
- il genotipo MIRU viene espresso sotto forma di codice a 24 numeri, ciascuno dei quali corrisponde alle ripetizioni presenti in un determinato *locus* (dato che non esiste una convenzione universalmente accettata per l'ordine dei *loci*, ciascun numero deve essere sempre abbinato alla specifica del *locus* a cui corrisponde).

Tab. 4 - COMPOSIZIONE IN μL DELLE MIX DI REAZIONE PER LE PCR TRIPLEX DA USARE CON IL METODO MANUALE^a.

	Protocollo A	Protocollo B	Protocollo C	Protocollo D
Acqua	22,8	24,8	23,8	25,8
10x PCR buffer (15 mM MgCl₂)	5,0	5,0	5,0	5,0
Soluzione Q 5x	10,0	10,0	10,0	10,0
MgCl₂ (25 mM)	3,0	1,0	2,0	–
dNTPs (5 mM ognuno)	2,0	2,0	2,0	2,0
Primer (Fw e Rev)	1,0	1,0	1,0	1,0
Taq polimerasi (5 U/μL)	0,2	0,2	0,2	0,2
Totale	45	45	45	45

^a Protocollo A per i loci: MIRU 4, 26, 40, Mtub 30, Mtub 39, Qub-4156; Protocollo B per i loci: MIRU 10, 16, 31, Mtub 29, ETRB, Mtub 34; Protocollo C per i loci: MIRU 2, 23, 39; Protocollo D per i loci: MIRU 20, 24, 27, Mtub 04, ETRC, ETRA, Qub-11 b, Mtub 21; Qub-26.

Tab. 5 - PRIMER UTILIZZATI PER L'AMPLIFICAZIONE NELLA MIRU-VNTR 24; NELLA METODICA AUTOMATIZZATA I PRIMER SONO MARCATI CON UN FLUOROFORO^a.

Locus	Nome alternativo	Lunghezza della ripetizione (pb)	Sequenza 5'-3' (fluoroforo legato al primer)
580	MIRU 4	77	GCGCGAGAGCCCCGAAGTGC (FAM) GCGCAGCAGAAACGCCAGC
2996	MIRU 26	51	TAGGTCTACCGTGC AAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG (VIC)
802	MIRU 40	54	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCCAAAATCAGATA
960	MIRU 10	53	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)
1644	MIRU 16	53	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCCTCGTGACGCCCTGGTAC (VIC)
3192	MIRU 31	53	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT (NED)
424	Mtub04	51	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC (FAM)
577	ETR C	58	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
2165	ETRA	75	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT
2401	Mtub30	58	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
3690	Mtub39	58	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG

SEQUE →

Locus	Nome alternativo	Lunghezza della ripetizione (pb)	Sequenza 5'-3' (fluoroforo legato al primer)
4156	Qub4156	59	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT (NED)
2163b	QUB-11b	69	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)
1955	Mtub21	57	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC (VIC) CAACATCGCCTGGTTCTGTA
4052	QUB-26	111	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGGCCAGGTCTTCCCGAT
154	MIRU 2	53	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT (FAM)
2531	MIRU 23	53	CTGTGCGATGGCCGCAACAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTTCGCCCTTTTGTC
4348	MIRU 39	53	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)
2059	MIRU 20	77	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA
2687	MIRU 24	54	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)
3007	MIRU 27	53	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)
2347	Mtub29	57	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
2461	ETR B	57	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
3171	Mtub34	54	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC

^a La concentrazione iniziale per tutti i primer non marcati è 20 pmol/μL. La concentrazione per i primer marcati è: 2 pmol/μL per i loci 577, 3690 e 1955; 8 pmol/μL per il locus 4052; 20 pmol/μL per il locus 4156 e 4 pmol/μL per tutti gli altri loci.

Tab. 6 - CICLI E TEMPERATURE DI AMPLIFICAZIONE PER MIRU-VNTR 24.

VNTR metodo manuale			VNTR metodo automatizzato		
Tempo	Temperatura	Numero di cicli	Tempo	Temperatura	Numero di cicli
15 min	95 °C	1	15 min	95 °C	1
1 min	95 °C	30	1 min	94 °C	40
1 min	59 °C		30 sec	59 °C	
90 sec	72 °C	1	90 sec	72 °C	1
10 min	72 °C		10 min	72 °C	
∞	4 °C	1	∞	4 °C	1

**Tab. 7 - DECODIFICA
NUMERO DI TANDEM REPEAT
PRESENTI NEI DIVERSI LOCI
IN RELAZIONE AL PESO
MOLECOLARE.**

N. tandem repeat	Loci																							
	154	424	577	580	802	960	1644	1955	2059	2163b	2165	2347	2401	2461	2531	2687	2996	3007	3171	3192	3690	4052	4156	4348
0	402	537	171	175	354	482	565	92	437	77	195	335	247	347	150	395	285	498	326	492	272	187	563	540
1	455	588	208	252	408	537	618	149	514	146	270	392	305	404	200	447	336	551	380	545	330	298	622	593
2	508	639	266	329	462	590	671	206	591	215	345	449	363	461	253	501	387	604	434	598	388	409	681	646
3	561	690	324	406	516	643	724	263	668	284	420	506	421	518	306	555	438	657	488	651	446	520	740	699
4	614	741	382	483	570	696	777	320	745	353	495	563	479	575	359	609	489	710	542	704	504	631	799	752
5	667	792	440	560	624	749	830	377	822	422	570	620	537	632	412	663	540	763	596	757	562	742	858	805
6	720	843	498	637	678	802	883	434	899	491	645	677	595	689	465	717	591	816	650	810	620	853	917	858
7	773	894	556	714	732	855	936	491	976	560	720	734	653	746	518	771	642	869	704	863	678	964	976	911
8	826	945	614	791	786	908	989	548	1053	629	795	791	711	803	571	825	693	922	758	916	736	1075	1035	964
9	879	996	672	868	840	961	1042	605	1130	698	870	848	769	860	624	879	744	975	812	969	794	1186	1094	1017
10	932	1047	730	945	894	1014	1095	662	1207	767	945	905	827	917	677	933	795	1028	866	1022	852	1297	1153	1070
11	985	1098	788	1022	948	1067	1148	719	1284	836	1020	962	885	974	730	987	846	1081	920	1075	910	1408	1212	1123
12	1038	1149	846	1099	1002	1120	1201	776	1361	905	1095	1019	943	1031	783	1041	897	1134	974	1128	968	1519	1271	1176
13	1091	1200	904	1176	1056	1173	1254	833	1438	974	1170	1076	1001	1088	836	1095	948	1187	1028	1181	1026	1630	1330	1229
14	1144	1251	962	1253	1110	1226	1307	890	1515	1043	1245	1133	1059	1145	889	1149	999	1240	1082	1234	1084	1741	1389	1282
15	1197	1302	1020	1330	1164	1279	1360	947	1592	1112	1320	1190	1117	1202	942	1203	1050	1293	1136	1287	1142	1852	1448	1335

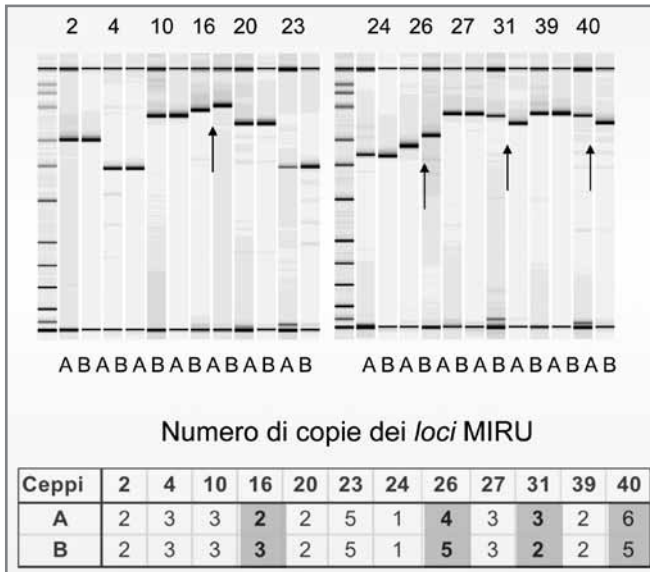


Fig. 12.3 - CONFRONTO DEI PROFILI MIRU-VNTR DEI CEPPI A E B.

Metodo automatizzato:

a) Preparazione del campione:

- mettere 100 µL di tampone TE o acqua sterile in una provetta da 2 mL e sospenderci 4-5 colonie;
- incubare per 30 minuti a 95 °C (inattivazione/estrazione);
- centrifugare a 13.000 rpm e raccogliere il surnatante.

b) Preparazione della piastra per l'amplificazione:

Esistono miscele di reazione pronte per l'uso, ma è possibile anche la preparazione *in-house* (tab.8). Il sistema commerciale (MIRU-VNTR *Typing Kit*, Genoscreen) utilizza piastre da 96 pozzetti, dove ogni pozzetto contiene una *mix* di reazione *quadruplex*, in cui i *primer* sono marcati con un fluoroforo; con una piastra è possibile analizzare 14 ceppi più un controllo positivo e uno negativo.

c) Preparazione della piastra per il sequenziatore:

Per poter essere analizzati, i singoli prodotti di PCR devono essere trasferiti in un'altra piastra contenente un marker di peso molecolare di range da 80 a 1200 pb, diluito in acqua o formammide.

- trasferire 2 µL di ogni amplificato nel corrispondente pozzetto della piastra contenente il marker;
- denaturare il DNA a 95 °C per 5 minuti;
- centrifugare.

d) Interpretazione dei risultati:

La prima volta il sequenziatore deve essere calibrato per costruire un dataset contenente le informazioni a cui farà riferimento per le analisi successive.

Per ciascun pozzetto il sequenziatore produce un file contenente i dati relativi ai *loci* amplificati (tre in caso di PCR *triplex*, quattro per la *quadruplex*) e al marker di peso molecolare. Tale file dovrà poi essere analizzato utilizzando un apposito software (GeneMapper o GeneMarker) che,

in base ai valori del marker, permette di stimare il peso molecolare dei prodotti di PCR e, conseguentemente, il numero di ripetizioni alleliche. L'interpretazione è automatizzata e si basa sul fatto che, per ciascun *locus*, la presenza di un picco in una determinata posizione corrisponde a un preciso numero di ripetizioni alleliche (fig. 12.4).

Il genotipo MIRU viene espresso sotto forma di codice a 24 numeri indicanti, per ciascun *locus*, il numero di *tandem repeat* presenti (dato che non esiste una convenzione universalmente accettata per l'ordine dei *loci* ciascun numero deve essere sempre abbinato alla specifica del *locus* a cui corrisponde).

Utilizzando il codice MIRU-VNTR è possibile confrontare il ceppo in esame con ceppi appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex genotipizzati in tutto il mondo, utilizzando un database di rapida e semplice consultazione disponibile on line (www.miru-vntrplus.org/)

Tab. 8 - COMPOSIZIONE (IN μ L) DELLE MIX DI REAZIONE TRIPLEX USATE PER I VARI *LOCI* MIRU-VNTR 24 NEL METODO AUTOMATIZZATO.

	<i>Loci</i>							
	580 2996 802	960 1644 3192	424 577 2165	2401 3692 4156	2163b 1955 4052	154 2531 4348	2059 2687 3007	2347 2461 3171
H₂O	7,5	8,3	8,7	7,5	8,7	7,9	8,7	8,3
Tampone 10x	2	2	2	2	2	2	2	2
Soluzione Q 5x	4	4	4	4	4	4	4	4
MgCl₂ (25 mM)	1,2	0,4	–	1,2	–	0,8	–	0,4
dNTPs (5 mM)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Primer (ciascuno)*	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Taq polimerasi	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
Totale	18	18	18	18	18	18	18	18

* 3 coppie (*forward* e *reverse*). La concentrazione iniziale per tutti i *primer* non marcati è 20 pmol/ μ L.
Per i *primer* marcati: 2 pmol/ μ L per i *loci* 577, 3690, 1955; 8 pmol/ μ L per il *locus* 4052; 20 pmol/ μ L per il *locus* 4156 e 4 pmol/ μ L per tutti gli altri *loci*.

12.1.3. SPOLIGOTYPING

Lo *Spacer Oligonucleotide Typing* o *Spoligotyping* è, per la semplicità e soprattutto per la rapidità di esecuzione, poiché si avvale dell'amplificazione, una delle tecniche più diffuse per la genotipizzazione dei micobatteri tubercolari. È basato sul polimorfismo del *locus* DR di *Mycobacterium tuberculosis* complex; tale regione contiene da 9 a 50 copie identiche della sequenza DR (*Direct Repeat*), che comprende 36 pb, separate l'una dall'altra da sequenze spaziatrici (*spacer*) tutte diverse fra loro, la cui lunghezza è variabile fra 35 e 41 pb (30). La sequenza genica degli spaziatori tra due sequenze DR specifiche (fra la prima e la seconda, fra la seconda e la terza e così via) è conservata in tutti i ceppi (30). Lo *Spoligotyping* rileva la presenza, o l'assenza, nel *locus* DR di *Mycobacterium tuberculosis* complex, dei singoli *spacer*. Si usa, a tale scopo, l'ibridizzazione su una

membrana di nitrocellulosa, su cui sono immobilizzate le sonde specifiche per le singole sequenze spaziatrici (fig. 12.5).

Ceppi diversi differiscono per la presenza o l'assenza di singoli spaziatori e il pattern di tali *spacer* viene definito "spoligotipo".

Fra le caratteristiche dello *Spoligotyping* sono rilevanti le seguenti:

- l'utilizzo dell'amplificazione ne permette l'esecuzione a partire da poche unità batteriche presenti in coltura o addirittura direttamente da campioni clinici (10, 30);
- lo spoligotipo, essendo espresso come presenza o assenza dei singoli *spacer*, è facilmente convertibile in codice numerico (16, 18);
- la possibilità di raggruppare i ceppi in famiglie con particolari caratteristiche filogenetiche; tipico esempio è la famiglia Beijing, il cui pattern è tipicamente caratterizzato dalla presenza degli *spacer* 35-43 (40, 61);
- la differenziazione delle specie all'interno del *Mycobacterium tuberculosis* complex (29, 39);
- il limitato potere discriminatorio, nettamente inferiore rispetto a quello di RFLP e MIRU-VNTR (20, 39, 51, 57).

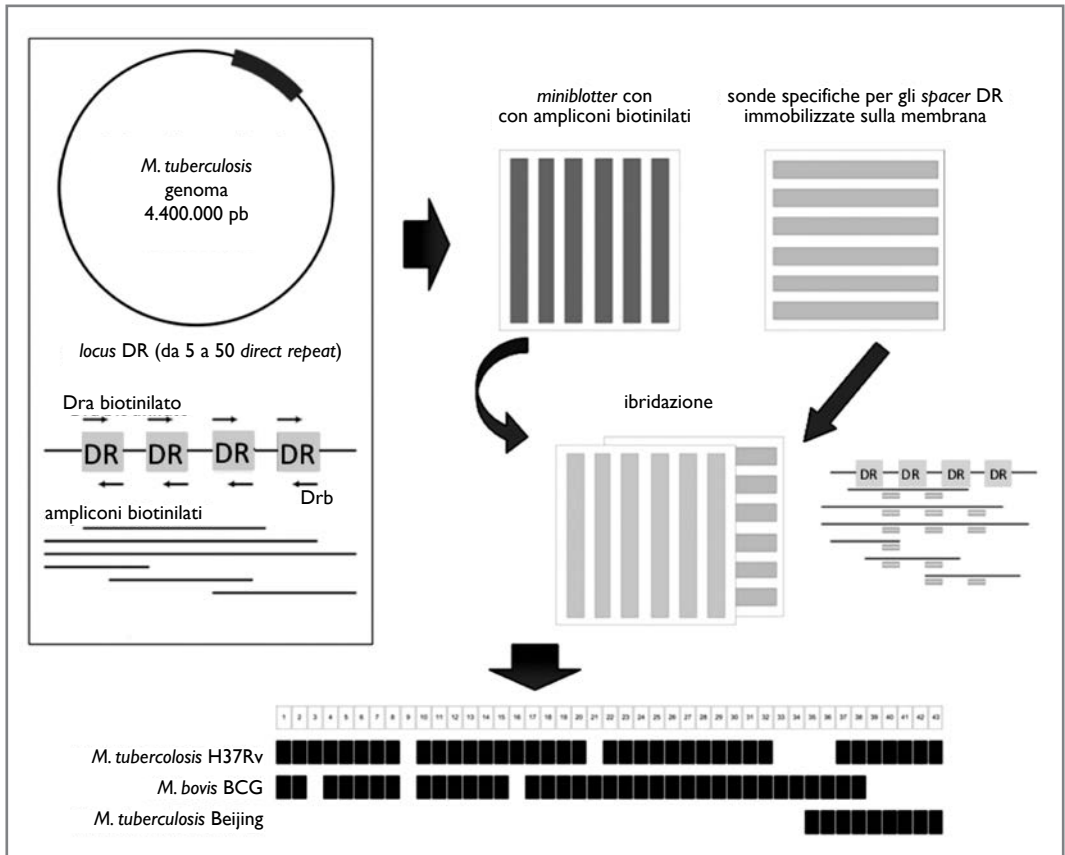


Fig. 12.5 - SPOLIGOTYPING.

12.1.3.1. PROTOCOLLO DELLO SPOLIGOTYPING

a) Preparazione del campione:

- porre 150 µL di tampone TE in una provetta Eppendorf da 2 mL e stemperarvi 3-5 colonie;
- incubare a 95 °C per 30 minuti, per lisare i micobatteri ed estrarre il DNA (è anche possibile utilizzare il DNA estratto con fenolo/cloroformio precipitato e concentrato con etanolo assoluto);
- il DNA estratto può essere conservato a -20 °C.

b) Preparazione della *mix* per la PCR:

si utilizzano i *primer*:

- Dra: 5'- GGTTTTGGGTCTGACGAC -3', marcato con biotina in 5' (da conservare a 2-8 °C)
- Drb: 5'- CCGAGAGGGGACGGAAAC -3' non marcato (da conservare a -20 °C)
che si appaiano alle estremità delle sequenze DR; tali *primer*, essendo diretti verso l'esterno di tali sequenze (tutte identiche fra di loro), amplificano tutti gli *spacer* presenti;
- in una stanza dedicata, preparare la *mix* (tab. 9) per i il numero di ceppi da amplificare più tre controlli (controlli positivi: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e *Mycobacterium bovis* BCG; controllo negativo: tampone TE);
- in una stanza dedicata, dispensare 45 µL di *mix* in provette sterili da 0,5 µL e aggiungervi 5 µL di DNA estratto;
- eseguire l'amplificazione secondo il protocollo riportato in tabella 10;
- conservare gli amplificati a 4 °C fino al momento del caricamento;
- verificare i prodotti di amplificazione mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% (90V per 30 minuti).

Tab. 9 - COMPOSIZIONE (IN µL) DELLE MIX DI REAZIONE PER LO SPOLIGOTYPING.

Reagente	Per 1 reazione	Per 43 reazioni
Acqua sterile	29,8	1281,4
Tampone 10x	5,0	215
dNTPs (2.5 µM)	2,0	86
DRa <i>primer</i> (20 pM)	4,0	172
DRb <i>primer</i> (20 pM)	4,0	172
Taq polimerasi (5 U/µL)	0,2	8,6
DNA	5,0	

Tab. 10 - CICLI E TEMPERATURE DI AMPLIFICAZIONE PER SPOLIGOTYPING.

Tempo	Temperatura	Cicli
15 min	95 °C	1
1 min	96 °C	30
1 min	55 °C	
30 sec	72 °C	
5 min	72 °C	1
∞	4 °C	1

c) Ibridizzazione:

- lavare accuratamente con sapone l'apparato di *blotting* e sciacquarlo abbondantemente;
- tenendo la membrana per i lembi, inumidirla due volte, per 5 minuti ciascuna volta, in 250 mL di SSPE 0,1%/SDS 2x (100 mL SSPE 20x + 5 mL SDS 20% + H₂O q.b. a L 1) a 60 °C;
- deporre la membrana (contenente le sonde complementari ai singoli *spacer*, immobilizzate in linee parallele) sul supporto scanalato (*miniblotter*), in modo che la faccia su cui sono legate le sonde sia rivolta verso le scanalature e che le scanalature siano perpendicolari alla linea degli *spacer*;
- coprire l'altra faccia della membrana con la guarnizione apposita, applicarvi sopra il coperchio del *miniblotter* e serrare la pressa (fig. 12.6);

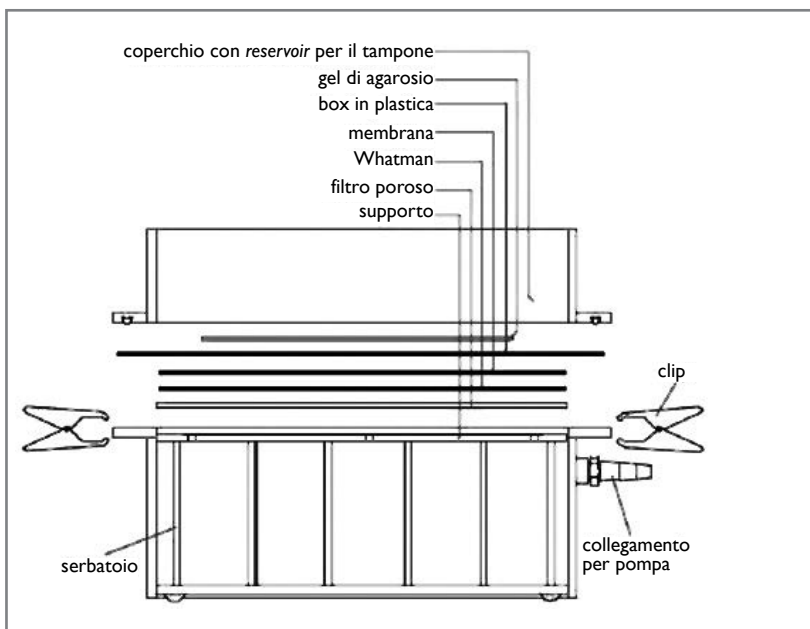


Fig. 12.6 -
APPARATO DI
BLOTTING.

- diluire 20 μ L di ciascun amplificato (massimo 43 amplificati per membrana) in 150 μ L di tampone SSPE 0,1%/SDS 2x;
- riscaldare ciascuna provetta contenente l'amplificato a 100 °C per 10 minuti e, immediatamente dopo, immergerla in ghiaccio;
- posizionare il *miniblotter* con la piastra scanalata verso l'alto e utilizzare una pompa a vuoto per rimuovere eventuali residui di liquido rimasti nelle scanalature;
- riempire attraverso il foro terminale la prima e l'ultima scanalatura del *miniblotter* con 150 μ L di tampone SSPE 0,1%/SDS 2x;
- riempire ciascuna delle scanalature rimanenti con circa 150 μ L di amplificato, annotando l'ordine di caricamento. Occorre evitare la formazione di bolle; le scanalature devono essere riempite completamente, evitando però ogni eccesso che potrebbe contaminare le scanalature adiacenti (utilizzare carta assorbente per eliminare gli eccessi di liquido);

- incubare a 60 °C per un'ora, tenendo il *miniblotter* in posizione orizzontale al riparo da urti che potrebbero causare contaminazioni fra scanalature adiacenti;
- rimuovere i campioni dalle scanalature mediante aspirazione seguendo l'ordine di riempimento;
- dopo aver svuotato tutte le scanalature, disassemblare il *miniblotter* e rimuovere la membrana;
- lavare la membrana due volte in 250 mL di SSPE 0,5% 2x/SDS (100 mL SSPE 20x + 25 mL SDS 20% + H₂O q.b. a L 1) a 60 °C per 10 minuti in una vaschetta in agitazione o in bottiglie rotanti;
- lavare la membrana due volte in 250 mL di SSPE 2x (100 mL SSPE 20x + 25 mL SDS 20% + H₂O q.b. a L 1) a temperatura ambiente per 10 minuti, in agitazione;
- porre la membrana in una bottiglia di ibridizzazione, in modo che il lato contenente gli *spacer* non sia a contatto con la parete della bottiglia;
- assicurarsi che la membrana rimanga a una temperatura inferiore a 42 °C (per non inattivare la perossidasi);
- aggiungere alla bottiglia una soluzione di coniugato streptavidina-perossidasi diluita 1/4000 (3,5 µL di coniugato streptavidina-perossidasi in 14 mL di SSPE 0,5%/SDS 2x) e incubare a 42 °C per 90 minuti;
- lavare la membrana due volte in 250 mL di SSPE 0,5%/SDS 2x a 42 °C per 10 minuti, in agitazione;
- sciacquare la membrana due volte in 250 mL di SSPE 2x, per almeno 5 minuti, a temperatura ambiente e in agitazione;
- immediatamente prima dell'uso, preparare 20 mL di liquido di rivelazione, miscelando 5 mL di ciascuna delle soluzioni fornite dal kit ECL (GE Healthcare);
- incubare la membrana in 20 mL di soluzione di rivelazione ECL per 1 minuto, agitando dolcemente in modo che tutta la membrana sia uniformemente a contatto con il liquido (le membrane sono idrofobiche);
- porre la membrana all'interno di un supporto in plastica (avendo cura di rimuovere eventuali bolle d'aria ed evitando di generare corrente elettrostatica);
- in un apparecchio per autoradiografia esporre per un minuto una pellicola ECL (Hyperfilm ECL), ponendola a contatto con il lato della membrana contenente gli oligonucleotidi;
- sviluppare la pellicola;
- esporre una seconda pellicola per 5 minuti e una terza per 20 minuti, in modo che anche i segnali più deboli vengano rilevati;
- lavare la membrana due volte in 250 mL di EDTA 20 mM a pH 8 (40 mL 0,5 EDTA + H₂O q.b. a L 1) per 15 minuti a temperatura ambiente, in agitazione;
- conservare la membrana a 4 °C in un contenitore di plastica sigillato, oppure avvolta in pellicola di plastica per prevenirne l'essiccamento.

d) Interpretazione:

Sull'immagine fotografica (fig. 12.7) sono presenti delle macchie scure in corrispondenza degli *spacer* presenti nel ceppo in esame, mentre nessun segnale si ha in corrispondenza degli *spacer* assenti. Il risultato può essere espresso in forma grafica (equivalente a un codice binario) oppure utilizzando un codice ottale (fig. 12.8).

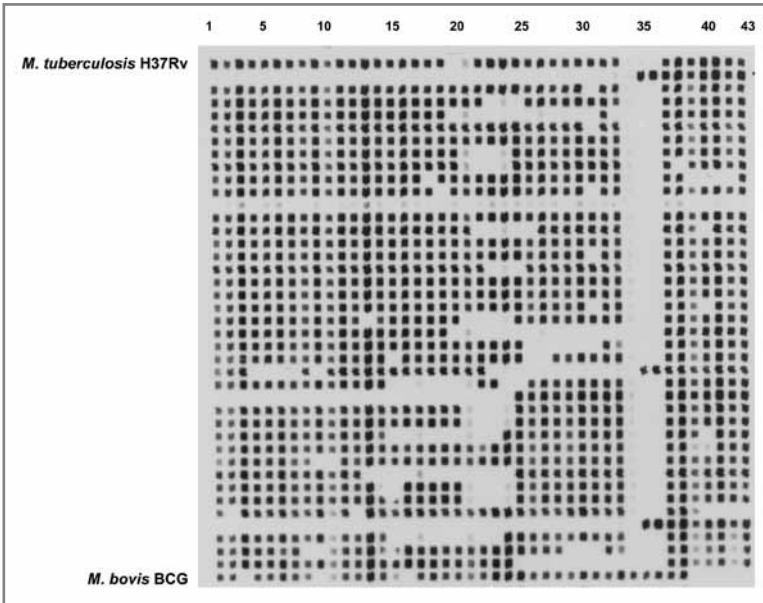
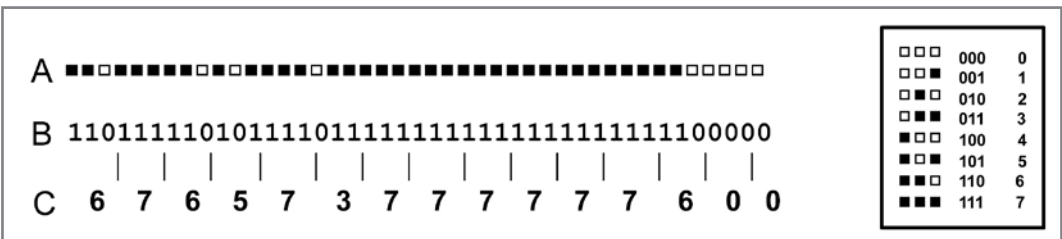


Fig. 12.7 - PROFILI DI SPACER DEL LOCUS DR.

Fig. 12.8 - SPOLIGOTIPO. A: RAPPRESENTAZIONE GRAFICA, B: CODICE BINARIO, C: CODICE OTTALE.



Le membrane possono essere riutilizzate dopo aver rimosso i prodotti di amplificazione ibridizzati. Dato che gli *spacer* sono legati covalentemente alle membrane, il metodo di rimozione deve essere fortemente stringente. A tal fine:

- lavare la membrana due volte mediante incubazione a 85 °C, per 30 minuti, in 250 mL di SDS 1%, in una vaschetta in agitazione o in bottiglie rotanti;
- lavare la membrana due volte in 250 mL di EDTA 20 mM a pH 8, per 15 minuti, a temperatura ambiente in agitazione;
- conservare la membrana a 4 °C avvolta in un involucro Saran, per prevenirne l'essiccamento fino al successivo utilizzo.

12.1.3.2. SPOLIGOTYPING E GENETICA DELLE POPOLAZIONI

Lo *Spoligotyping* trova la sua principale applicazione negli studi di filogenesi di *Mycobacterium tuberculosis* complex, dal momento che permette di raggruppare i ceppi in famiglie. Alcune famiglie sono rappresentate in tutto il mondo, altre invece hanno una distribuzione geografica più ristretta.

Mediante lo *Spoligotyping* è anche possibile differenziare le specie incluse nel *Mycobacterium tuberculosis* complex; i profili delle varie specie sono riportati in figura 12.9.

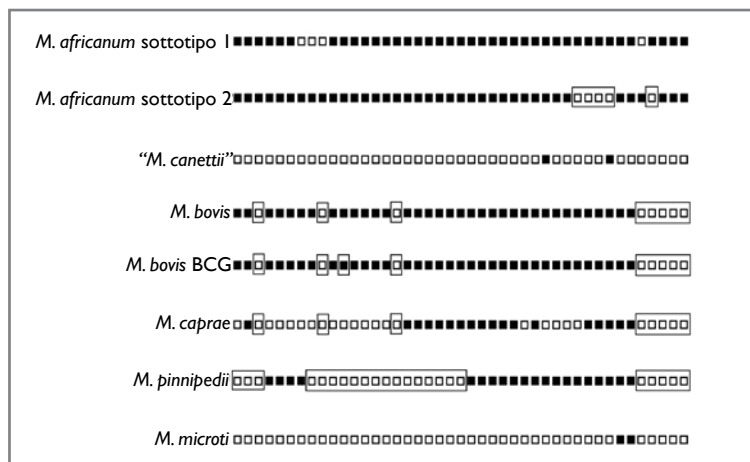


Fig. 12.9 - SPOLIGOTIPI
DELLE VARIE SPECIE DEL
M. TUBERCULOSIS COMPLEX.

12.2. UTILIZZO DEI DIVERSI METODI DI GENOTIPIZZAZIONE

La genotipizzazione mediante RFLP ha costituito per molti anni il *gold standard* grazie al suo elevatissimo potere discriminatorio, ma l'avvento della tecnica MIRU (tab. 11) ha cambiato rapidamente la situazione; tale metodica, infatti, più rapida, in quanto utilizza l'amplificazione, e meno complessa, sta assumendo un ruolo progressivamente più rilevante.

Lo *Spoligotyping*, nonostante il suo limitato potere discriminatorio, è riuscito ad affermarsi, senza subire la concorrenza dell'RFLP, grazie al diverso campo di applicazione mirato essenzialmente a studi di filogenesi e di distribuzione geografica. Sembra oggi probabile che la situazione non sia destinata a cambiare a seguito della transizione da RFLP a MIRU.

L'accesso dibattuto che ha accompagnato l'ascesa della genotipizzazione MIRU-VNTR, in cui i diversi Autori hanno cercato di dimostrare la superiorità di una tecnica sull'altra, ha evidenziato che un semplice confronto di indici (indice di clusterizzazione, indice di variabilità intrinseca della regione analizzata, potere discriminatorio) non è in grado di dare risposte definitive, anche in considerazione del fatto che tali indici non tengono conto del grado di omogeneità dei genotipi, individuati con le diverse metodiche, circolanti in una determinata popolazione (14, 33).

Pare comunque accertato che nessuna delle tecniche attualmente in uso costituisca la soluzione definitiva; esistono infatti promettenti alternative, quali l'analisi di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) sparsi in centinaia di *loci* diversi (*Multi-Locus Sequence Analysis*, MLSA), l'analisi completa del genoma, l'analisi di ulteriori *spacer* in aggiunta ai 43 attualmente usati nello *Spoligotyping* e l'analisi di altri *loci* MIRU oltre ai 24 attualmente studiati (14, 25).

La clonalità caratteristica del *Mycobacterium tuberculosis* complex, che determina una variabilità genomica minima tra i ceppi, suggerisce che le tecniche del futuro non potranno non essere che la MLSA e, ancor più, il sequenziamento dell'intero genoma (14, 25).

Attualmente è possibile affermare che due o più ceppi con lo stesso spoligotipo e lo stesso profilo VNTR-24 hanno un'altissima probabilità:

- di essere cross-contaminazioni di laboratorio, se isolati da campioni processati nello stesso giorno e provenienti da pazienti senza legami epidemiologici;

- di appartenere a un focolaio epidemico riconducibile a un soggetto indice, se provenienti da pazienti con storia di contatto.

Quest'ultima affermazione non è tuttavia trasferibile a studi di più ampia portata, come i programmi di sorveglianza nazionali o internazionali. In tali scenari, l'identificazione di isolati identici non ne permette automaticamente l'attribuzione a un focolaio epidemico; è necessario, infatti, tener conto anche di fattori ulteriori, quali tempo, spazio, evoluzione convergente e ipervirulenza di particolari genotipi. Per un genotipo circolante in una particolare area geografica sono infatti bassissime le probabilità di rispecchiare una trasmissione recente riconducibile a un unico caso indice. Per questo motivo, i programmi nazionali ritengono gli indici di clusterizzazione, di trasmissione e le caratteristiche demografiche dei pazienti essere parametri rilevanti per differenziare trasmissioni recenti o probabili riattivazioni (11, 13, 27, 46). Per la valutazione degli indici di trasmissione recente, l'analisi dei *cluster* deve tenere in considerazione non solo il numero di *cluster* presenti in un determinato Paese, ma valutare anche il numero di isolati appartenenti ai singoli *cluster* e le particolari caratteristiche delle singole famiglie. Basandosi su queste evidenze, alcuni Paesi hanno deciso di adottare una strategia a due fasi che prevede inizialmente l'utilizzo di *Spoligotyping* e VNTR 24 e, qualora si ritenga necessaria una discriminazione più approfondita, l'impiego di RFLP di IS6110 (12, 15).

Tab. 11 - CARATTERISTICHE DELLE VARIE TECNICHE DI EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE.

	RFLP di IS6110	MIRU-VNTR 24	Spoligotyping
Potere discriminatorio	Elevatissimo	Elevatissimo	Limitato
Bersaglio	Genoma (non amplificato)	Loci MIRU (amplificati)	Locus DR (amplificato)
Formato di output	Pattern di bande	Codice numerico (24 numeri)	Codice numerico (binario: 43 cifre; ottale: 15 cifre)
Correlazione con le specie del <i>M. tuberculosis</i> complex	Alcune specie all'interno del complex possono essere identificate	Per le diverse specie si usano diversi loci	Spoligotipi specifici per ciascuna specie
Database	–	www.miru-vntrplus.org/	www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/
Caratteristiche	Esecuzione complessa, tempi lunghi	Esecuzione relativamente semplice (24 amplificazioni), 48 ore circa	Esecuzione semplice (singola amplificazione)
Utilizzo	Epidemiologia (già <i>gold standard</i>)	Epidemiologia (attuale <i>gold standard</i> in combinazione con lo <i>Spoligotyping</i>)	Studi di distribuzione geografica
Correlazioni fra RFLP e MIRU	Corrispondenza biunivoca di alcuni pattern RFLP con alcuni pattern MIRU		
Correlazioni fra RFLP e spoligotipi	Alcuni pattern RFLP sono specifici di particolari spoligotipi		
Correlazioni fra MIRU e spoligotipi	Corrispondenza biunivoca di alcuni pattern MIRU con alcuni spoligotipi		

12.3. UTILIZZO DELLA GENOTIPIZZAZIONE NELLA GESTIONE CLINICA DEL PAZIENTE

Nella pratica clinica, la genotipizzazione degli isolati può essere utilizzata per accertare se una coltura positiva sia dovuta a cross-contaminazione di laboratorio e per distinguere le reinfezioni esogene dalle riattivazioni endogene.

12.3.1. CROSS-CONTAMINAZIONI DI LABORATORIO

Si stima che circa il 3% degli isolamenti di *Mycobacterium tuberculosis* complex siano frutto di contaminazioni crociate avvenute nel laboratorio che ha processato i campioni clinici (9, 41, 42). Un tale errore comporta, oltre all'esecuzione di un certo numero di indagini inutili e al ritardo della diagnosi corretta, anche, e soprattutto, il trattamento con farmaci antitubercolari di soggetti che, non solo non ne trarranno alcun vantaggio, ma che potranno subirne gli effetti collaterali.

Il dubbio che si sia in presenza di una cross-contaminazione di laboratorio deve insorgere ogni volta che:

- fra più campioni dello stesso paziente, tutti microscopicamente negativi, soltanto uno risulti positivo in coltura;
- più campioni, negativi all'esame microscopico e processati nella stessa giornata, assieme a uno o più campioni fortemente positivi all'esame microscopico, risultino positivi all'esame colturale.

In tali casi, se la diagnosi clinica di tubercolosi non è compatibile, è consigliata la genotipizzazione di tutti i ceppi isolati dai campioni processati nella stessa data di quello in questione. Il ritrovamento di ceppi identici, isolati da pazienti non epidemiologicamente correlati, indica una contaminazione crociata e dovrebbe portare alla revisione della diagnosi e alla sospensione del trattamento antitubercolare.

Poiché questa informazione deve essere disponibile in tempi brevi, la metodica di scelta è la MIRU-VNTR-24, i cui risultati possono essere disponibili entro un paio di giorni lavorativi (53, 54). Lo *Spoligotyping*, invece, pur essendo anch'esso basato sull'amplificazione genica e quindi eseguibile in tempi brevi, non è sufficientemente discriminativo.

12.3.2. RECIDIVE E REINFEZIONI

La genotipizzazione eseguita sui ceppi responsabili, nello stesso paziente, di diversi episodi di tubercolosi distanziati nel tempo, permette di chiarire se essi siano dovuti a una riattivazione endogena o a una nuova infezione. Nel caso in cui i ceppi abbiano identico genotipo si tratta di una riattivazione, il che indica che il trattamento antibiotico somministrato in precedenza non è stato sufficientemente efficace. In questi casi è raccomandata l'esecuzione del test di sensibilità, a livello genotipico, sull'isolato più recente, per verificare rapidamente se il ceppo abbia sviluppato resistenze non presenti nell'episodio precedente, ferma restando la necessità di effettuare, appena possibile, anche l'antibiogramma fenotipico (19, 28, 36, 37). Qualora invece i ceppi abbiano diverso genotipo, ci troviamo di fronte a una nuova infezione e si impone una nuova indagine epidemiologica per accertarne il caso indice.

Le reinfezioni, a differenza dalle recidive, non sono imputabili a fallimenti terapeutici.

12.4. USO DELLA GENOTIPIZZAZIONE NEI PROGRAMMI DI CONTROLLO DELLA TUBERCOLOSI

La genotipizzazione è stata usata per studiare le dinamiche di trasmissione della tubercolosi in Paesi sia a bassa che ad alta incidenza di malattia, e il suo impiego su larga scala ha permesso di identificare genotipi caratteristici di alcune aree geografiche (1, 5, 13, 26, 36, 40, 45, 59, 61).

Dal punto di vista della sanità pubblica, la genotipizzazione è molto utile per valutare l'efficienza dei programmi di controllo della malattia tubercolare, differenziando i casi non correlati fra loro dai veri e propri focolai epidemici riconducibili a un singolo caso indice, da cui si sia propagata l'infezione (2, 13, 15, 46). In presenza di sospetto di epidemia di tubercolosi, la genotipizzazione degli isolati, accanto all'investigazione epidemiologica tradizionale, può confermare o fugare tale ipotesi, a seconda che i ceppi isolati dai pazienti coinvolti nell'episodio siano, o meno, identici. L'utilità di tale distinzione è data dal fatto che le misure di sanità pubblica da adottare nei due casi sono molto diverse.

12.4.1. GRUPPI CON AUMENTATO RISCHIO DI INFEZIONE TUBERCOLARE

Numerosi studi hanno dimostrato che le dinamiche di trasmissione della tubercolosi sono molto variabili e spesso riflettono specifiche situazioni locali. Tali studi hanno contribuito all'identificazione di focolai di trasmissione di tubercolosi in comunità erroneamente non ritenute a rischio. Nei grossi agglomerati urbani, ad esempio, sono ad alto rischio di trasmissione della tubercolosi le case di accoglienza per senzatetto (2, 46). In altre aree geografiche, invece, i più importanti siti di contagio sono le strutture ricreative, come i locali pubblici, o i centri di aggregazione, come i centri sanitari (19, 23, 31, 32, 34, 46). L'identificazione dei gruppi ad alto rischio e delle modalità e dei luoghi di trasmissione dell'infezione permette una pianificazione razionale delle risorse di sanità pubblica deputate al controllo della diffusione della malattia (1, 11, 13, 17, 22, 23, 26, 36, 37, 45, 52, 56).

La genotipizzazione permette anche di stimare l'indice di trasmissione, cioè il numero di casi di tubercolosi generati da un singolo caso indice. Molto spesso un elevato indice di trasmissione indica un ritardo diagnostico e coinvolge prevalentemente gruppi che hanno un limitato accesso alle strutture sanitarie; meno frequentemente esso è legato a fattori sociali come il sovraffollamento (22, 50, 61).

12.4.2. INDAGINI SUI CONTATTI

L'epidemiologia molecolare è molto più sensibile, rispetto alle indagini epidemiologiche tradizionali, per quanto riguarda la capacità di ricostruire la catena di trasmissione tra pazienti infettati da uno stesso caso indice (1-3, 15, 17, 21).

Si stima, infatti, che i programmi di sanità pubblica che fanno uso delle metodiche di genotipizzazione abbiano una capacità di individuare i contatti superiore di 3-4 volte rispetto ai programmi basati sulle sole indagini epidemiologiche tradizionali (1, 15).

I lunghi tempi di risposta del metodo basato su RFLP di IS6110 hanno rappresentato in passato il principale ostacolo alla sua implementazione su ampia scala in campo diagnostico; attualmente esistono metodiche standardizzate e automatizzate, quali la MIRU-VNTR, che permettono l'identificazione rapida dei pazienti appartenenti a un cluster epidemico.

12.5. GENOTIPIZZAZIONE E PATOGENESI DELLA TUBERCOLOSI

Dalle banche dati che raccolgono i profili molecolari dei ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* complex, emerge che un numero limitato di famiglie micobatteriche è responsabile della maggior parte dei casi di tubercolosi; quindi, non tutti i ceppi sono egualmente virulenti o hanno la stessa potenzialità di trasmettere l'infezione e di favorirne l'evoluzione in malattia (24, 38, 49, 61). I dati di laboratorio hanno confermato questa osservazione dimostrando che, anche nell'infezione sperimentale di macrofagi, alcuni ceppi si dimostrano più virulenti di altri (24).

La famiglia Beijing, originaria della regione cinese di Pechino, ha causato epidemie in tutto il mondo (24, 49, 61, 63) ed è universalmente nota per la sua capacità di diffusione. Essa è la famiglia dominante in molte località dell'Asia e del Nord America, ma viene isolata con una certa frequenza anche in Europa, Africa e Australia. Dal punto di vista molecolare i membri della famiglia Beijing si caratterizzano per un'inserzione IS6110 nella regione di origine di replicazione del cromosoma di *Mycobacterium tuberculosis* e per uno spoligotipo specifico, nonché per altre sequenze di DNA peculiari. Fanno parte della famiglia Beijing anche i ceppotipi W, che hanno causato importanti epidemie di tubercolosi, farmaco-resistente o meno, nel nord-est degli Stati Uniti, e il ceppotipo 210, diffuso nel sud-ovest e nel centro-sud degli USA (1, 12, 40, 45, 61). Il fatto che i membri di questa famiglia siano caratterizzati dalla costante presenza di 16 siti di inserzione per IS6110 ha indotto alcuni Autori a ipotizzare che l'inserzione di IS6110 possa alterare l'espressione di geni ad esso adiacenti, in senso favorevole alla capacità di diffondersi nella popolazione (6). Secondo altri Autori, l'aumentata capacità di trasmissione dei ceppi Beijing potrebbe essere dovuta alla loro intrinseca capacità di produrre un'aerosolizzazione più efficiente con conseguente aumento della carica infettante e della probabilità di evoluzione da infezione a malattia.

In Europa, per il genotipo VNTR ECDC 0002, è stata recentemente segnalata un'associazione significativamente più alta, rispetto a tutti gli altri genotipi circolanti, con forme di tubercolosi XDR.

12.6. INCIDENZA DELLE REINFEZIONI

La convinzione diffusa che un individuo immunocompetente con infezione tubercolare latente, o guarito da malattia tubercolare, sia resistente a una successiva infezione causata da un altro ceppo è stata smentita dai dati ottenuti mediante tipizzazione molecolare in varie parti del mondo. Da studi condotti in Sudafrica ed Europa risulta, infatti, che la reinfezione esogena è responsabile di malattia in un numero di casi variabile fra il 16% e il 75% (5, 18, 48) e che tale percentuale è maggiore in popolazioni ad alta incidenza di tubercolosi, dove il rischio di esposizione a una nuova infezione è più elevato (19, 28, 35).

BIBLIOGRAFIA

1. Alland D., Kalkut G.E., Moss A.R., McAdam R.A., Hahn J.A., Bosworth W., Drucker E., Bloom B.R., *Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods*, 1994, *N Engl J Med*; 330:1710-1716.
2. Allos B.M., Gensheimer K.F., Bloch A.B., Parrotte D., Horan J.M., Lewis V., Schaffner W., *Management of an outbreak of tuberculosis in a small community*, 1996, *Ann Intern Med*; 125:114-117.
3. Andre M., Ijaz K., Tillinghast J.D., Krebs V.E., Diem L.A., Metchock B., Crisp T., McElroy P.D., *Transmission network analysis to complement routine tuberculosis contact investigations*, 2007, *Am J Public Health*; 97:470-471.
4. Bang D., Andersen P.H., Andersen A.B., Thomsen V.Ø., *Isoniazid-resistant tuberculosis in Denmark: mutations, transmission and treatment outcome*, 2010, *J Infect*; 60:452-457.
5. Banu S., Uddin M.K., Islam M.R., Zaman K., Ahmed T., Talukder A.H., Rahman M.T., Rahim Z., Akter N., Khatun R., Brosch R., Endtz H.P., *Molecular epidemiology of tuberculosis in rural Matlab, Bangladesh*, 2012, *Int J Tuberc Lung Dis*; 16:319-326.
6. Beggs M.L., Eisenach K.D., Cave M.D., *Mapping of IS6110 insertion sites in two epidemic strains of Mycobacterium tuberculosis*, 2000, *J Clin Microbiol*; 38:2923-2928.
7. Bifani P., Kurepina N., Mathema B., Wang X.M., Kreiswirth B., *Genotyping of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis*, 2009, *Methods Mol Biol*; 551:173-188.
8. Brown T.J., Nikolayevskyy V.N., Drobniowski F.A., *Typing Mycobacterium tuberculosis using variable number tandem repeat analysis*, 2009, *Methods Mol Biol*; 465:371-394.
9. Burman W.J., Reves R.R., *Review of false-positive cultures for Mycobacterium tuberculosis and recommendations for avoiding unnecessary treatment*, 2000, *Clin Infect Dis*; 31:1390-1395.
10. Cafrune P.I., Possuelo L.G., Ribeiro A.W., Ribeiro M.O., Unis G., Jarczewski C.A., Rossetti M.L., Zaha A., *Prospective study applying spoligotyping directly to DNA from sputum samples of patients suspected of having tuberculosis*, 2009, *Can J Microbiol*; 55:895-900.
11. Castro K.G., Jaffe H.W., *Rationale and methods for the National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network*, 2002, *Emerg Infect Dis*; 8:1188-1191.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *Monitoring tuberculosis programs - National Tuberculosis Indicator Project, United States, 2002-2008*, 2010, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*; 59:295-298.
13. Clark C.M., Driver C.R., Munsiff S.S., Driscoll J.R., Kreiswirth B.N., Zhao B., Ebrahimzadeh A., Salfinger M., Piatek A.S., Abdelwahab J., *Universal genotyping in tuberculosis control program, New York City, 2001-2003*, 2006, *Emerg Infect Dis*; 12:719-724.
14. Comas I., Homolka S., Niemann S., Gagneux S., *Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies*, 2009, *PLoSone*; 4:e7815.
15. Cook V.J., Shah L., Gardy J., Bourgeois A.C., *Recommendations on modern contact investigation methods for enhancing tuberculosis control*, 2011, *Int J Tuberc Lung Dis*; 16:297-305.

16. Dale J.W., Brittain D., Cataldi A.A., Cousins D., Crawford J.T., Driscoll J., Heersma H., Lillebaek T., Quitugua T., Rastogi N., Skuce R.A., Sola C., van Soolingen D., Vincent V., *Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardised nomenclature*, 2001, *Int J Tuberc Lung Dis*; 5:216-219.
17. De Vries G., van Hest R.A., Burdo C.C., van Soolingen D., Richardus J.H., *A Mycobacterium tuberculosis cluster demonstrating the use of genotyping in urban tuberculosis control*, 2009, *BMC Infect Dis*; 9:151.
18. Demay C., Liens B., Burguière T., Hill V., Couvin D., Millet J., Mokrousov I., Sola C., Zozio T., Rastogi N., *SITVITWEB – a publicly available international multimarker database for studying Mycobacterium tuberculosis genetic diversity and molecular epidemiology*, 2012, *Infect Genet Evol*; 12:755-766.
19. Dobler C.C., Marks G.B., Simpson S.E., Crawford A.B., *Recurrence of tuberculosis at a Sydney chest clinic between 1994 and 2006: reactivation or reinfection?*, 2008, *Med J Aust*; 188:153-155.
20. Driscoll J.R., *Spoligotyping for molecular epidemiology of the Mycobacterium tuberculosis complex*, 2009, *Methods Mol Biol*; 551:117-128.
21. Erkens C.G., Kamphorst M., Abubakar I., Bothamley G.H., Chemtob D., Haas W., Migliori G.B., Rieder H.L., Zellweger J.P., Lange C., *Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus*, 2010, *Eur Respir J*; 36:925-949.
22. Farnia P., Masjedi M.R., Varahram M., Mirsaeidi M., Ahmadi M., Khazampour M., Tabarsi P., Baghei P., Marjane M., Bahadori M., Zarifi A.Z., Velayati A.A., *The recent-transmission of Mycobacterium tuberculosis strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping*, 2008, *BMC Infect Dis*; 8:109.
23. Filia A., Ciarrocchi G., Belfiglio R., Caferra M., Bella A., Piersimoni C., Cirillo D., Grilli G., Mancini C., Greco D., *Tuberculosis in kindergarten and primary school, Italy, 2008-2009*, 2011, *Emerg Infect Dis*; 17:514-516.
24. Gagneux S., *Host-pathogen coevolution in human tuberculosis*, 2012, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 367:850-859.
25. García de Viedma D., Mokrousov I., Rastogi N., *Innovations in the molecular epidemiology of tuberculosis*, 2011, *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 29 Suppl 1:8-13.
26. Garzelli C., Lari N., Cuccu B., Tortoli E., Rindi L., *Impact of immigration on tuberculosis in a low-incidence area of Italy: a molecular epidemiological approach*, 2010; 16:1691-1697.
27. Glynn J.R., Vynnycky E., Fine P.E.M., *Influence of sampling on estimates of clustering and recent transmission of Mycobacterium tuberculosis derived from DNA fingerprinting techniques*, 1999, *Am J Epidemiol*; 149:366-371.
28. Gomes M.G., Aguas R., Lopes J.S., Nunes M.C., Rebelo C., Rodrigues P., Struchiner C.J., *How host heterogeneity governs tuberculosis reinfection?*, 2012, *Proc Biol Sci*; 279:2473-2478.
29. Gomgnimbou M.K., Refrégier G., Diabougba S.P., Adama S., Kaboré A., Ouiminga A., Sola C., *Spoligotyping of Mycobacterium africanum, Burkina Faso*, 2012, *Emerg Infect Dis*; 18:117-119.
30. Groenen P., Bunschoten A.E., van Soolingen D., van Embden J.D.A., *Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; Application for strain differentiation by a novel method*, 1993, *Mol Microbiol*; 10:1057-1065.

31. Harries A.D., Maher D., Nunn P., *Practical and affordable measures for the protection of health care workers from tuberculosis in low-income countries*, 1997, Bull World Health Organ; 75:477-489.
32. Harris T.G., Sullivan Meissner J., Proops D., *Delay in diagnosis leading to nosocomial transmission of tuberculosis at a New York City health care facility*, 2012, Am J Infect Control (Epub ahead of print).
33. Hunter P.R., Gaston M.A., *Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity*, 1988, J Clin Microbiol; 26:2465.
34. Jang M.H., Choi G.E., Shin B.M., Lee S.H., Kim S.R., Chang C.L., Kim J.M., *Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system with IS6110-restriction fragment length polymorphism for epidemiologic investigation of clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in Korea*, 2011, Korean J Lab Med; 31:282-284.
35. Jasmer R.M., Bozeman L., Schwartzman K., Cave M.D., Saukkonen J.J., Metchock B., Khan A., Burman WJ., Tuberculosis Trials Consortium., *Recurrent tuberculosis in the United States and Canada: relapse or reinfection?*, 2004, Am J Respir Crit Care Med; 170:1360-1366.
36. Kamper-Jørgensen Z., Andersen A.B., Kok-Jensen A., Bygbjerg I.C., Andersen P.H., Thomsen V.O., Kamper-Jørgensen M., Lillebaek T., *Clustered tuberculosis in a low burden country: nationwide genotyping through 15 years*, 2012, J Clin Microbiol; 50:2660-2667.
37. Kamper-Jørgensen Z., Andersen A.B., Kok-Jensen A., Kamper-Jørgensen M., Bygbjerg I.C., Andersen P.H., Thomsen V.O., Lillebaek T., *Migrant tuberculosis: the extent of transmission in a low burden country*, 2012, BMC Infect Dis; 12:60.
38. Kisa O., Tarhan G., Gunal S., Albay A., Durmaz R., Saribas Z., Zozio T., Alp A., Ceyhan I., Tombak A., Rastogi N., *Distribution of spoligotyping defined genotypic lineages among drug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates in Ankara, Turkey*, 2012, PLoS One; 7:e30331.
39. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., Haas W.H., Hermans P.W.M., Martín C., Palittapongarnpim P., Plikaytis B.B., Riley L.W., Yakrus M.A., Musser J.M., van Embden J.D.A., *Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: inter-laboratory study of discriminatory power and reproducibility*, 1999, J Clin Microbiol; 37:2607-2618.
40. Lari N., Rindi L., Bonanni D., Tortoli E., Garzelli C., *Beijing/W Mycobacterium tuberculosis in Italy*, 2004, Emerg Infect Dis; 10:958-959.
41. Lee M.R., Chung K.P., Chen W.T., Huang Y.T., Lee L.N., Yu C.J., Teng L.J., Hsueh P.R., Yang P.C., Luh K.T., *Epidemiologic surveillance to detect false-positive Mycobacterium tuberculosis cultures*, 2012, Diagn Microbiol Infect Dis; 73:343-349.
42. Martínez M., García de Viedma D., Alonso M., Andrés S., Bouza E., Cabezas T., Cabeza I., Reyes A., Sánchez-Yebra W., Rodríguez M., Sánchez M.I., Rogado M.C., Fernández R., Peñafiel T., Martínez J., Barroso P., Lucerna M.A., Diez L.F., Gutiérrez C., *Impact of laboratory cross-contamination on molecular epidemiology studies of tuberculosis*, 2006, J Clin Microbiol; 44:2967-2969.
43. Mathema B., Kurepina N., Fallows D., Kreiswirth B.N., *Lessons from molecular epidemiology and comparative genomics*, 2008, Semin Respir Crit Care Med; 29:467-480.
44. Mazars E., Lesjean S., Banuls A.L., Gilbert M., Vincent V., Gicquel B., Tibayrenc M., Locht C., Supply P., *High resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology*, 2001, Proc Natl Acad Sci USA; 98:1901-1906.

45. Metcalfe J.Z., Kim E.Y., Lin S.Y., Cattamanchi A., Oh P., Flood J., Hopewell P.C., Kato-Maeda M., *Determinants of multidrug-resistant tuberculosis clusters, California, USA, 2004-2007*, 2010, *Emerg Infect Dis*; 16:1403-1409.
46. Miramontes R., Winston C.A., Haddad M.B., Moonan P.K., *Use of tuberculosis genotyping for postoutbreak monitoring*, 2012, *J Public Health Manag Pract*; 18:375-378.
47. Ota I., Gomez A.B., Kremer K., de Haas P., García M.J., Martín C., van Soolingen D., *Mapping of IS6110 insertion sites in Mycobacterium bovis isolates in relation to adaptation from the animal to human host*, 2008, *Vet Microbiol*; 129:333-341.
48. Roetzer A., Schuback S., Diel R., Gasau F., Ubben T., di Nauta A., Richter E., Rüsç-Gerdes S., Niemann S., *Evaluation of Mycobacterium tuberculosis typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany*, 2011, *J Clin Microbiol*; 49:4173-4178.
49. Sandegren L., Groenheit R., Koivula T., Ghebremichael S., Advani A., Castro E., Pennhag A., Hoffner S., Mazurek J., Pawlowski A., Kan B., Bruchfeld J., Meleforts Ö., Källenius G., *Genomic stability over 9 years of an isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis outbreak strain in Sweden*, 2011, *PLoS One*; 6:e16647.
50. Schluger N.W., Huberman R., Holzman R., Rom W.N., Cohen D.I., *Screening for infection and disease as a tuberculosis control measure among indigents in New York City, 1994-1997*, 1999, *Int J Tuberc Lung Dis*; 3:281-286.
51. Schürch A.C., van Soolingen D., *DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis: from phage typing to whole-genome sequencing*, 2012, *Infect Genet Evol*; 12:602-609.
52. Small P.M., Hopewell P.C., Singh S.P., Paz A., Parsonnet J., Ruston D.C., Schechter G.F., Daley C.L., Schoolnik G.K., *The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods*, 1994, *N Engl J Med*; 330:1703-1709.
53. Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soolingen D., Lochter C., *Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units*, 2001, *J Clin Microbiol*; 39:3563-3571.
54. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsç-Gerdes S., Willery E., Savine E., de Haas P., van Deutekom H., Roring S., Bifani P., Kurepina N., Kreiswirth B., Sola C., Rastogi N., Vatin V., Gutierrez M.C., Fauville M., Niemann S., Skuce R., Kremer K., Lochter C., van Soolingen D., *Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number Tandem Repeat typing of Mycobacterium tuberculosis*, 2006, *J Clin Microbiol*; 44:4498-4510.
55. Thorne N., Borrell S., Evans J., Magee J., García de Viedma D., Bishop C., Gonzalez-Martin J., Gharbia S., Arnold C., *IS6110-based global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis*, 2011, *Infect Genet Evol*; 11:132-138.
56. Tostmann A., Kik S.V., Kalisvaart N.A., Sebek M.M., Verver S., Boeree M.J., van Soolingen D., *Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands*, 2008, *Clin Infect Dis*; 47:1135-1142.
57. Van Embden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P., Martín C., McAdam R., Shinnick T.M., Small P.M., *Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting. Recommendations for a standardized methodology*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:406-409.
58. Van Rie A., Warren R., Richardsdon M., Victor T.C., Gie R.P.E.D.A., Beyers N., van Helden P.D., *Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment*, 1999, *N Engl J Med*; 341:1174-1179.

59. Van Soolingen D., Borgdorff M.W., de Haas P.E.W., Sebek M.M.G.G., Veen J., Dessens M., Kremer K., van Embden J.D.A., *Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: A nationwide study from 1993 through 1997, 1999*, J Infect Dis; 180:726-736.
60. Varma-Basil M., Kumar S., Arora J., Angrup A., Zozio T., Banavaliker J.N., Singh U.B., Rastogi N., Bose M., *Comparison of spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive units typing and IS6110-RFLP in a study of genotypic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Delhi, North India, 2011*, Mem Inst Oswaldo Cruz; 106:524-535.
61. Wang W., Hu Y., Mathema B., Jiang W., Kreiswirth B., Xu B., *Recent transmission of W-Beijing family Mycobacterium tuberculosis in rural eastern China, 2012*, Int J Tuberc Lung Dis; 16:306-312.
62. Weniger T., Krawczyk J., Supply P., Harmsen D., Niemann S., *Online tools for polyphasic analysis of Mycobacterium tuberculosis complex genotyping data: now and next, 2012*, Infect Genet Evol; 12:748-754.
63. Zhang J., Abadia E., Refregier G., Tafaj S., Boschirolì M.L., Guillard B., Andremont A., Ruimy R., Sola C., *Mycobacterium tuberculosis complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay, 2010*, J Med Microbiol; 59:285-294.

Capitolo 13

LA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

**Daniela Maria Cirillo,
Federica Piana,
Daniela Marchetti**

13. LA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

13.1. L'INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

Per “infezione tubercolare latente” (LTBI, *Latent Tuberculosis Infection*) si intende l'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* in assenza di segni clinici, radiologici e batteriologici di malattia in atto.

Nel 90% dei soggetti la risposta immunitaria, prevalentemente di tipo cellulo-mediato, riesce a contenere l'azione patogena dei micobatteri mantenendo lo stato di latenza dell'infezione. Nel rimanente 10% dei casi, l'infezione evolve in malattia tubercolare conclamata. La probabilità di progressione da LTBI a malattia attiva decresce con l'aumentare del tempo trascorso dal momento dell'infezione. Circa il 50% delle riattivazioni si verifica, anche in pazienti immunocompetenti, entro due anni dal momento in cui è stata contratta l'infezione, ma la malattia può svilupparsi anche successivamente, in qualsiasi periodo della vita. Qualsiasi abbassamento delle difese dell'organismo, causato da fattori endogeni o esogeni, favorisce la riattivazione dei micobatteri dormienti e l'insorgenza di malattia.

Il decorso subclinico e asintomatico dell'infezione latente e la mancanza di test diagnostici specifici rendono problematica l'identificazione dei soggetti infetti.

L'identificazione della LTBI e il conseguente trattamento chemioterapico dei soggetti infetti sono uno dei punti chiave per i programmi di eradicazione della malattia tubercolare nei Paesi industrializzati (5). La terapia della LTBI diminuisce infatti di circa il 60% il rischio di passaggio alla malattia attiva (42).

13.2. DIAGNOSI DI INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

13.2.1. L'INTRADERMOREAZIONE SECONDO MANTOUX

Per decenni la diagnosi di LTBI si è basata sull'intradermoreazione secondo Mantoux (nota anche come TST, *Tuberculosis Skin Test*), le cui basi biologiche sono schematizzate nella figura 13.1.

Introdotta nella pratica clinica nel 1890 come test tubercolinico, l'intradermoreazione è, dopo l'esame microscopico, il più antico test diagnostico batteriologico ancora in uso; essa valuta la risposta immunitaria cellulo-mediata (ipersensibilità di tipo ritardato) al derivato proteico purificato (*Purified Proteic Derivative*, PPD, che ha sostituito la miscela di antigeni grezzi nota come “tubercolina di Koch”).

Il test deve essere eseguito iniettando 0,1 mL, pari a 5 unità, di PPD, per via intradermica, nella superficie volare dell'avambraccio. Della tubercolina RT23 del Serum Institut di Copenhagen devono essere utilizzate 2 unità.

Il test dovrebbe essere letto da 48 a 72 ore dopo l'iniezione, tuttavia le reazioni positive possono essere rilevate fino a una settimana dall'inoculo. L'intensità della risposta immunitaria al test Mantoux è determinata misurando il diametro trasverso dell'infiltrato. Deve essere misurata solamente la parte indurita, e non l'area eritematosa, preferibilmente col “test della penna” che garanti-

sce una buona riproducibilità. La presenza di eritema in assenza di indurimento equivale ad un test negativo. Il risultato deve essere registrato in millimetri. L'interpretazione del test come positivo o negativo viene fatta in base all'appartenenza a classi di rischio (tab. 1).

Il PPD è un cocktail di antigeni micobatterici estratti da *Mycobacterium tuberculosis*, alcuni dei quali sono comuni a diverse specie non tubercolari e al ceppo vaccinale *Mycobacterium bovis* BCG.

Per tale ragione, il test Mantoux ha una bassa specificità nelle popolazioni a elevata copertura vaccinale con BCG e in quelle in cui l'esposizione ai micobatteri non tubercolari è frequente. Anche la sensibilità è bassa, in particolar modo in presenza di condizioni che causano deficit immunitari, quali AIDS, immunosoppressioni iatrogene, tubercolosi avanzata, malnutrizione, infanzia e vecchiaia, nonché nelle fasi iniziali della malattia tubercolare.

Vi sono inoltre varie problematiche inerenti al test. La corretta esecuzione dell'inoculo non è infatti semplicissima, in quanto esso deve essere effettuato in sede rigorosamente intradermica e la lettura è difficilmente standardizzabile, in quanto risente molto della soggettività dell'operatore. Queste caratteristiche rendono il test poco riproducibile, soprattutto se eseguito da personale non adeguatamente addestrato. La lettura va eseguita dopo 48-72 ore, cosa che comporta notevole disagio per il paziente, tanto che talora non si ripresenta.

Vi sono inoltre prove che l'intradermoreazione possa agire come una microvaccinazione determinando l'attivazione di cellule T specifiche, con conseguente aumento della risposta in test seriali (effetto booster) (33).

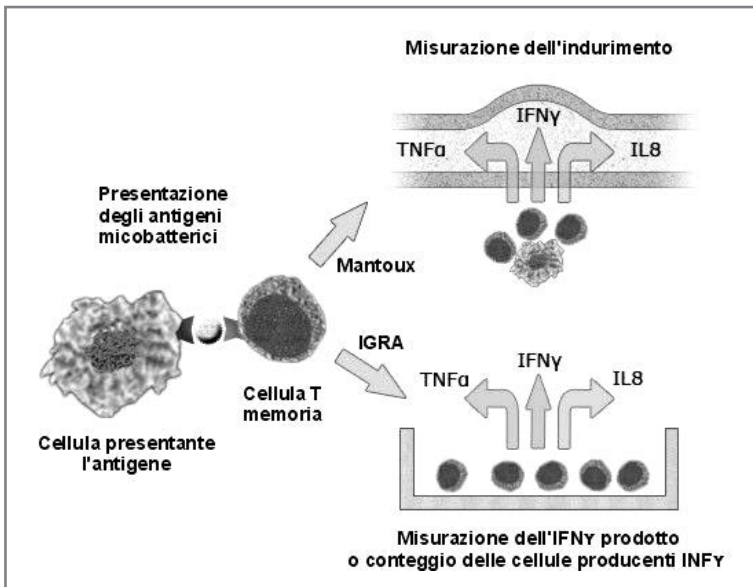


Fig. 13.1 - BASI BIOLOGICHE DELL'INTRADERMOREAZIONE SECONDO MANTOUX E DEI TEST IGRA.

Tab. I - CRITERI INTERPRETATIVI DELL'INTRADERMOREAZIONE SECONDO MANTOUX, PER GRUPPI DI RISCHIO.

≥5 mm	Diametro dell'indurimento	
	≥10 mm	≥15 mm
<p>Soggetti HIV-positivi</p> <p>Contatti recenti di pazienti con tubercolosi</p> <p>Soggetti con lesioni fibrotiche compatibili con pregressa tubercolosi al quadro radiologico</p> <p>Pazienti con trapianto d'organo; pazienti in trattamento immunosoppressivo (per esempio, a cui è somministrato l'equivalente di ≥15 mg/die di prednisone per 1 mese o più)</p>	<p>Persone di recente immigrazione (es. entro i 5 anni) da Paesi ad alta endemia tubercolare</p> <p>Tossicodipendenti (uso di droghe per via parenterale)</p> <p>Residenti e personale delle seguenti comunità ad alto rischio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - luoghi di detenzione e carceri - strutture per lungodegenti per anziani - ospedali e altre strutture sanitarie - strutture residenziali per pazienti affetti da AIDS - ricoveri per <i>homeless</i> <p>Personale dei laboratori di micobatteriologia</p> <p>Soggetti con condizioni cliniche ad alto rischio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - silicosi - diabete mellito - insufficienza renale cronica - patologie ematologiche (es. leucemie e linfomi) - neoplasie maligne specifiche (es. carcinoma della testa, del collo o del polmone) - perdita del 10% del peso corporeo ideale - gastrectomia - bypass digiuno-ileale <p>Bambini di età inferiore a 5 anni</p> <p>Neonati, bambini e adolescenti esposti ad adulti ad alto rischio di sviluppo di tubercolosi attiva</p>	<p>Soggetti senza alcun fattore di rischio conosciuto</p>

13.2.2. INTERFERON-GAMMA RELEASE ASSAY

I test denominati con l'acronimo di IGRA (*Interferon-Gamma Release Assay*) si basano sulla produzione interferone- γ (IFN- γ) da parte dei linfociti T, in presenza di antigeni nei confronti dei quali tali linfociti erano stati sensibilizzati in precedenza. La produzione di IFN- γ da parte di linfociti ci-mentati con antigeni del bacillo tubercolare presuppone quindi un precedente contatto con l'agente infettivo. Gli antigeni peptidici utilizzati dai sistemi commerciali sono ESAT-6 (*Early Secretory Antigen Target 6*) e CFP-10 (*Culture Filtrate Protein 10*), codificati da geni localizzati all'interno della *Region of Difference 1* (RD-1) del genoma di *Mycobacterium tuberculosis* (19). Questi antigeni sono più specifici rispetto al PPD, in quanto la RD-1 è presente in tutte le specie del *Mycobacterium tuberculosis* complex ad eccezione del ceppo vaccinale BCG, mentre manca nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari (con l'eccezione di *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium gastris*, *Mycobacterium szulgai* e poche altre specie meno note) (33). Tali antigeni inducono una forte risposta immunitaria da parte dei linfociti T in modelli sperimentali (2).

Sono commercialmente disponibili due diversi test: QuantiFERON-TB Gold (Cellestis) e T-SPOT.TB (Oxford Immunotec).

Il test QuantiFERON-TB Gold:

- permette il dosaggio, mediante tecnica ELISA, dell'IFN- γ prodotto dai linfociti T sensibilizzati;
- utilizza una miscela di tre antigeni (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7);
- si esegue su sangue intero;
- è dotato di un controllo positivo (fitoemoagglutinina);
- è approvato dalla US Food and Drug Administration (FDA) e considerato l'alternativa al test cutaneo nelle linee guida pubblicate dal CDC (25).

Il test T-SPOT.TB (33):

- permette la conta dei linfociti T sensibilizzati che producono IFN- γ , utilizzando la tecnologia *Enzyme-Linked Immunospot* (ELISPOT);
- utilizza una miscela di due antigeni (ESAT-6, CFP-10);
- richiede la separazione delle cellule mononucleate del sangue periferico;
- è dotato di un controllo positivo;
- è approvato dalla FDA e considerato quale alternativa al test cutaneo nelle linee guida pubblicate dai CDC (30).

Entrambi i test sono approvati dalle linee guida britanniche stilate dal National Institute for Health and Clinical Excellence (28). Tali linee guida raccomandano una strategia a due livelli, in cui l'intradermoreazione di Mantoux funge da test di screening e il cui risultato, se positivo o inattendibile, dovrebbe essere confermato da uno dei test IGRA. Tale proposta è stata fatta propria dalle linee guida congiunte delle Società italiane di pneumologia (3). Si tratta di protocolli tuttora in discussione che necessitano di una valutazione su larga scala per quanto riguarda sia l'impatto clinico che quello economico (10). Recentemente, l'ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) si è espresso a favore dell'utilizzo degli IGRA per l'identificazione degli individui infetti da sottoporre a trattamento preventivo, ma ha sottolineato la necessità di definire linee guida europee per quanto riguarda l'applicabilità e l'adeguatezza di questi test (17).

13.2.3. SENSIBILITÀ DEGLI IGRA

La principale difficoltà nel determinare la sensibilità di un test per la diagnosi di LTBI consiste nell'assenza di un *gold standard* con cui confrontarlo. Si è pensato così di correlare l'esposizione all'agente infettante al rischio di infezione, valutando due parametri: vicinanza al caso indice e durata del contatto. Si assume infatti che la probabilità di infezione sia elevata per i soggetti che hanno avuto un prolungato e ravvicinato contatto, in ambiente chiuso, con un paziente bacillifero, e molto bassa per coloro per i quali non risulti esposizione.

13.2.3.1. SENSIBILITÀ NEI SOGGETTI IMMUNOCOMPETENTI

Le metanalisi disponibili (17, 21, 26) evidenziano una sensibilità sub-ottimale per quanto riguarda l'identificazione della LTBI; i valori emergenti dai dati aggregati sono infatti: 67% per il QuantiFERON, 87% per il T-SPOT.TB e 71% per il TST (tab. 2).

Il valore predittivo degli IGRA, per quanto riguarda la progressione verso la tubercolosi attiva, è stato indagato seguendo per circa due anni (lasso di tempo in cui maggiore è la possibilità di svilup-

pare la malattia) soggetti con LTBI (IGRA-positivi) che avevano rifiutato la terapia preventiva. Tale valore è risultato compreso tra 2,8% e 14,6% per il QuantiFERON, tra 3,3% e 10% per il T-SPOT.TB e tra 2,3% e 3,1% per il TST (13). In una recente metanalisi (14) si sottolinea il più elevato valore predittivo degli IGRA rispetto al TST.

Tab. 2 - SENSIBILITÀ DEI VARI TEST NEI PAZIENTI IMMUNOCOMPETENTI (DA 17, MODIFICATA).

	Sensibilità	CI 95% ^a	Numero di studi	Numero di soggetti con risultato non “indeterminato”
QuantiFERON	67%	46-78	3	133
T-SPOT.TB	87%	78-95	8	337
Mantoux	71%	65-74	14	437

^a CI: intervallo di confidenza.

13.2.3.2. SENSIBILITÀ NEI SOGGETTI IMMUNODEPRESSI

La categoria dei pazienti immunodepressi è eterogenea, rientrano infatti in essa soggetti con patologie ematologiche, HIV-positivi, individui che ricevono terapia immunosoppressiva (quale anti-TNF- α) e portatori di deficit genetici.

I soggetti che hanno un deficit nella risposta cellulo-mediata sono ad alto rischio di progressione dalla LTBI alla malattia attiva; è pertanto fondamentale che, una volta accertata la LTBI, vengano sottoposti a terapia. In tali pazienti la sensibilità della Mantoux è inferiore al 50%, mentre numerosi studi suggeriscono che la sensibilità degli IGRA sia superiore e che, tra i due test commerciali, quella del T-SPOT.TB sia la più elevata (26).

La presenza nei test IGRA del controllo positivo (mitogeno) permette di individuare i soggetti anergici, nei quali un risultato “negativo” del test è da considerare e refertare “indeterminato”, in quanto potenzialmente legato a una risposta immunitaria insufficiente.

Il numero di soggetti con un test “indeterminato”, ovvero con un elevato background nel controllo negativo o con scarsa reattività al controllo positivo, è più elevato negli immunodepressi rispetto ai soggetti immunocompetenti (26) ed è inversamente proporzionale al livello dei linfociti CD4+ circolanti. Il numero dei risultati “indeterminati” risulta più basso nel T-SPOT.TB rispetto al QuantiFERON (18).

I pochi studi disponibili comprendono spesso pazienti con gradi differenti di immunodepressione; una valutazione della performance degli IGRA in questa categoria di pazienti risulta pertanto problematica (13).

13.2.3.3. SENSIBILITÀ NEI BAMBINI

In letteratura esistono numerose review e metanalisi dedicate all'utilizzo dei test IGRA nei bambini.

L'ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) affronta specificamente tale argomento (17), giungendo a importanti conclusioni:

- i problemi più importanti nella diagnosi dell'infezione tubercolare riguardano i bambini al di sotto dei cinque anni di età;
- i bambini al di sotto dei due anni di età, essendo ad elevato rischio di sviluppare la malattia, debbono, in caso di contatto con pazienti bacilliferi, essere sottoposti a terapia preventiva, indipendentemente dal risultato dei test IGRA;
- nei bambini al di sotto dei cinque anni di età, nessuna delle tre strategie possibili (solo Mantoux, solo IGRA o l'approccio a due step) può essere usata per escludere la LTBI o la tubercolosi attiva;
- nei bambini, a causa della difficoltà di raccogliere materiale respiratorio idoneo, la diagnosi di tubercolosi attiva richiede la valutazione di una serie di test; fra questi anche gli IGRA possono fornire informazioni utili;
- occorrono strumenti nuovi per la diagnosi della tubercolosi nei bambini: anche se esistono evidenze dell'utilità dei test IGRA, il cambio delle procedure in uso non è ritenuto opportuno.

Gli studi sull'utilizzo degli IGRA per la diagnosi di LTBI nei bambini hanno portato a conclusioni discordanti (24): secondo alcuni (23, 29, 35), essi hanno dimostrato una sensibilità maggiore rispetto al test Mantoux, secondo altri (16, 41) le performance di IGRA e TST sono sovrapponibili; non manca infine chi (8, 9) riporta una sensibilità degli IGRA inferiore a quella della Mantoux.

13.2.3.4. SENSIBILITÀ NEGLI OPERATORI SANITARI

Gli operatori sanitari sono una categoria a rischio per la LTBI, tanto che in passato era prevista per tutti la vaccinazione con BCG. La necessità di eseguire, in questi soggetti, il test in modo seriale, comporta il rischio, in caso di uso della Mantoux, di risultati falsamente positivi dovuti all'effetto booster (17). L'utilizzo degli IGRA supera questo problema, ma pone, in particolare per gli individui con valori prossimi al *cut-off*, quello della gestione delle conversioni/reversioni (38), frequenti negli operatori sanitari (34). L'ECDC riconosce che gli IGRA possono essere usati per avere un valore di *base-line*, ma sottolinea che al momento non esistono, per questa categoria, evidenze tali da permettere giudizi definitivi (17), anche alla luce del fatto che gli studi disponibili sono talmente eterogenei da non permettere una metanalisi (40).

13.2.4. SPECIFICITÀ DEGLI IGRA

In assenza di un *gold standard* per la diagnosi di infezione tubercolare latente, gli studi effettuati sugli IGRA hanno calcolato la specificità su individui sani provenienti da Paesi a bassa prevalenza di tubercolosi e privi di contatti noti con casi bacilliferi (13, 26). In una metanalisi a cura di TBNET/ECDC (13) emerge una specificità degli IGRA elevata (98-100%), e non falsata dalla precedente vaccinazione con BCG, contro una specificità dell'intradermoreazione alla tubercolina pari all'88,7% (tab. 3). Gli Autori, pur riconoscendo che lo studio si basa su un numero limitato di osservazioni, concludono che, in individui a basso rischio di infezione e in Paesi a bassa prevalenza, gli IGRA sono uno strumento diagnostico migliore rispetto alla Mantoux.

Il valore predittivo negativo degli IGRA, per quanto riguarda la progressione verso la malattia attiva, è elevato: 99,8% per il QuantiFERON, 97,8% per T-SPOT.TB e 99,7% per TST (13).

Tab. 3 - SPECIFICITÀ DEI VARI TEST (DA 17, MODIFICATA).

	Specificità	CI 95% ^a	Numero di studi	Numero di soggetti con risultato non "indeterminato"
QuantiFERON	99,4%	97,9-99,9	4	346
T-SPOT.TB	98	86,8-99,9	1	40
Mantoux	88,7%	84,6-92	3	309

^a CI: intervallo di confidenza.

13.2.5. DISCORDANZE FRA IGRA E TEST CUTANEO

La maggior parte degli studi riporta una concordanza dei risultati modesta (tra il 60% e l'80%) fra IGRA e Mantoux (26), con quest'ultima meno specifica nei soggetti vaccinati con BCG e meno sensibile in quelli in età avanzata, affetti da epatite C, da alcolismo, da insufficienza renale, da neoplasie o in terapia immunosoppressiva.

Circa un quinto dei pazienti non vaccinati con BCG e affetti da micobatteriosi non tubercolari sono risultati Mantoux-positivi/IGRA-negativi; positività degli IGRA, per le specie *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium marinum* sono state segnalate in letteratura (26).

In uno studio tedesco (30), in soggetti testati sia con il test Mantoux che con test IGRA si registrano discordanze nel 15,4% dei casi e la maggior parte di queste era dovuta a Mantoux positiva e a IGRA negativo. La maggior parte (85,1%) di queste discordanze riguardava migranti vaccinati con BCG. Quasi la metà dei casi Mantoux-negativi/IGRA-positivi erano spiegabili con l'età avanzata. In studi che hanno valutato, su contatti di paziente bacillifero, la sensibilità dei test IGRA e Mantoux in relazione al tempo di esposizione alla fonte di infezione, alcuni Autori (36) hanno evidenziato per gli IGRA una correlazione nettamente più alta di quella della Mantoux; altri (22) hanno rilevato, al contrario, un rapporto diretto con la durata dell'esposizione nei soggetti TST-positivi/IGRA-negativi.

La riproducibilità dei risultati dei test IGRA è stata indagata in diversi studi condotti in Paesi ad alta (11, 43, 44) e a bassa prevalenza (4, 37). In generale, la riproducibilità risulta elevata per quanto riguarda il dato qualitativo (positività/negatività), ma bassa per i valori quantitativi (concentrazione di IFN- γ o numero di spot) con variazioni del ± 60 -70% rispetto alla media.

13.2.6. UTILIZZO DEI TEST PER LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI ATTIVA E PER IL FOLLOW-UP DELLA TERAPIA

La positività dei test IGRA attualmente disponibili non permette di distinguere tra tubercolosi attiva e tubercolosi latente.

Le linee guida dell'ECDC consigliano di non disgiungere mai il risultato del test IGRA da un'attenta valutazione del contesto clinico. Nei Paesi a bassa prevalenza tubercolare, un risultato positivo può essere, in presenza di sospetto clinico, un indizio di malattia tubercolare attiva; nei Paesi ad alta endemia, un test positivo è invece meno predittivo di tubercolosi attiva. Soltanto in uno studio (15) è prospettata la possibilità che un test negativo possa servire a escludere la diagnosi di tubercolosi; a conclusioni opposte giungono vari Autori (12, 26, 32), i quali, avendo riscontrato una sensibilità sub-ottimale del test QuantiFERON, ritengono che un risultato negativo non possa essere usato

come solo parametro per escludere la diagnosi di tubercolosi attiva; il test risulta infatti negativo in oltre il 10% di malattia tubercolare in fase iniziale.

Una review ha valutato la sensibilità dei vari test disponibili nei pazienti con sospetto clinico di tubercolosi attiva: le sensibilità risultanti dall'aggregazione dei dati erano dell'80% per il QuantiFERON, dell'81% per il T-SPOT.TB e del 65% per il TST. Restringendo l'indagine ai soli casi di tubercolosi confermata si notava un lieve aumento delle performance, soprattutto per il T-SPOT.TB (39) (tab. 4).

Secondo l'ECDC, nella maggior parte dei casi, gli IGRA non costituiscono un valore aggiunto rispetto ai metodi diagnostici tradizionali, anche se, in certe situazioni cliniche, quali la tubercolosi extrapulmonare, pazienti con escreato negativo all'esame microscopico o all'esame colturale, bambini, o nella diagnosi differenziale con l'infezione da micobatteri non tubercolari, gli IGRA possono offrire un'informazione utile (17).

L'utilità dell'impiego degli IGRA per la valutazione della risposta alla terapia antitubercolare è stata indagata in diversi studi ma, mentre secondo alcuni (6), nei pazienti con tubercolosi attiva, la risposta a ESAT-6 diminuisce durante la terapia, secondo altri (1) tale risposta subisce un incremento. Lavori pubblicati recentemente ipotizzano che una diminuzione della risposta all'antigene sia predittiva di una risposta positiva alla terapia antitubercolare (7). Secondo altri (1), il test si negativizzerebbe in risposta alla terapia solo nei pazienti con infezione recente (20). Al momento attuale, è generalmente accettato che gli IGRA non possano essere usati per il follow-up della terapia né della tubercolosi attiva né dell'infezione latente (17, 27).

Tab. 4 - SENSIBILITÀ DEI VARI TEST IN PAZIENTI CON SOSPETTO CLINICO [E CON DIAGNOSI MICROBIOLOGICA] DI TUBERCOLOSI (DA 17, MODIFICATA)

	Sensibilità	CI 95% ^a	Numero di studi	Numero di soggetti con risultato non "indeterminato"
QuantiFERON	80 [81] %	75-84 [78-84]	8	348
T-SPOT.TB	81 [92] %	78-84 [90-93]	15	749
Mantoux	65 [68] %	61-68 [63-72]	12	703

^a CI: intervallo di confidenza.

13.2.7. I TEST COMMERCIALI

13.2.7.1. QUANTIFERON-TB GOLD *IN-TUBE*

Principio:

QuantiFERON-TB Gold *In-Tube* (commercializzato in Italia da ADA) è un test diagnostico *in vitro*, eseguibile su sangue intero eparinizzato, che utilizza antigeni peptidici derivati dalle proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 per stimolare la risposta immune cellulo-mediata di eventuali linfociti T sensibilizzati.

La rilevazione, mediante il dosaggio immunoenzimatico ELISA, dell'IFN- γ rilasciato in seguito alla stimolazione, consente di accertare se i linfociti T siano stati attivati in precedenza dal contatto con *Mycobacterium tuberculosis*.

Reagenti:

Il sistema QuantiFERON-TB Gold *In-Tube* si compone di:

- Provetta controllo negativo (con tappo grigio e anello bianco, da usare ad altitudini comprese tra livello del mare e 810 m; con tappo grigio e anello giallo da utilizzare tra 1020 m e 1875 m).
- Provetta antigene TB con una miscela degli antigeni ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 (con tappo rosso e anello bianco da usare ad altitudini comprese tra livello del mare e 810 m; con tappo rosso e anello giallo da utilizzare tra 1020 m e 1875 m);
- Provetta controllo mitogeno con fitoemoagglutina (con tappo viola e anello bianco, da usare ad altitudini comprese tra livello del mare e 810 m; con tappo viola e anello giallo da utilizzare tra 1020 m e 1875 m);
- Se il prelievo viene eseguito ad altitudini che non rientrano nei range sopra indicati, o se il volume raccolto è insufficiente, occorre prelevare il sangue con una siringa e trasferirne 1 mL in ciascuna delle tre provette;
- Kit immunoenzimatico ELISA per il dosaggio dell'IFN- γ , comprensivo di standard di IFN- γ per la costruzione di una curva di calibrazione.

Procedimento:

Il sistema QuantiFERON-TB Gold *In-Tube* prevede la raccolta di 1 mL di sangue intero in ciascuna delle provette sottovuoto. La provetta con il mitogeno che valuta lo stato immunitario del paziente diviene indispensabile per la corretta interpretazione del test soprattutto in pazienti immunodepressi.

La stimolazione dei linfociti avviene direttamente nelle provette, che devono essere incubate, entro 16 ore dal prelievo, a 37 °C per 16-24 ore. Al termine dell'incubazione le provette vengono centrifugate e il dosaggio ELISA dell'IFN- γ può essere eseguito direttamente sul plasma supernatante.

Se il test non può essere eseguito in tempi brevi è preferibile trasferire il plasma in un'altra provetta e conservarlo in frigorifero.

I pozzetti della piastra ELISA sono rivestiti da anticorpi anti-IFN- γ ; l'aggiunta successiva di un coniugato con nuovi anticorpi anti-IFN- γ e di un substrato cromogeno porta, rispettivamente, alla formazione di un *sandwich* e allo sviluppo di colore.

La provetta di controllo negativo serve per valutare il “rumore di fondo” dovuto ad anticorpi eterofili o alla presenza di IFN- γ non specifico nel campione di sangue. Sottraendo la quantità di IFN- γ della provetta del controllo negativo dalla quantità di IFN- γ delle provette degli antigeni e del mitogeno si determina la quantità di IFN- γ secreto in risposta, rispettivamente, alla stimolazione antigenica specifica e al mitogeno.

Per l'interpretazione dei risultati la ditta produttrice fornisce un software per l'analisi dei dati grezzi e per la verifica della linearità della curva degli standard. È comunque possibile effettuare il calcolo manualmente.

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Interpretazione:

Un test si considera negativo se la quantità di IFN- γ prodotto in risposta all'antigene è $<0,35$ UI/mL o se tale quantità non è superiore di almeno il 25% a quella prodotta nel controllo negativo.

Un test si considera positivo se la quantità di IFN- γ prodotto in risposta all'antigene è superiore a quella presente nel controllo negativo e $>0,35$ UI/mL. Una bassa produzione di IFN- γ ($<0,5$ UI/mL)

nella provetta contenente mitogeno indica un risultato “indeterminato”, sempre che il campione sia risultato non reattivo nella provetta contenente gli antigeni specifici. Un’eventualità di questo genere, oltre che all’incapacità dei linfociti del paziente di secernere IFN- γ , può essere legata a un numero di linfociti insufficiente, alla presenza di linfociti stressati a seguito di un trattamento inadeguato del campione o a procedure scorrette di riempimento e/o miscelazione della provetta con mitogeno.

Controllo di qualità:

I criteri da soddisfare per la validazione della curva degli standard prevedono che:

- la media delle densità ottiche (in duplicato) dello standard 1 sia $\geq 0,600$;
- il coefficiente di variabilità delle densità ottiche (in duplicato) degli standard 1 e 2 sia $\leq 15\%$
- le densità ottiche, in duplicato, degli standard 3 e 4 non si discostino dalla media di più di 0,040 unità di densità ottica;
- il coefficiente di correlazione calcolato sulla base dei valori medi di assorbanza degli standard sia $\geq 0,98$.

Qualora tali criteri non vengano soddisfatti, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Il test può essere automatizzato su vari strumenti per ELISA; recentemente però la ditta produttrice del QuantiFERON raccomanda lo strumento DSX, che è l’unico su cui la metodica sia stata validata.

13.2.7.2. T-SPOT.TB

Principio:

T-SPOT.TB (commercializzato in Italia da Nanogen) utilizza una versione semplificata della tecnica ELISPOT. Il test è concepito per individuare le cellule effettrici T che producono IFN- γ in risposta a una stimolazione da parte di antigeni specifici di *Mycobacterium tuberculosis*.

Reagenti:

Il sistema T-SPOT.TB si compone di:

- miscela di peptidi derivati dall’antigene ESAT-6;
- miscela di peptidi derivati dall’antigene CFP-10;
- controllo positivo (fitoemoagglutinina);
- terreno per colture cellulari AIMV (GIBCO);
- piastra per microtitolazione;
- kit immunoenzimatico ELISPOT per il rilevamento dell’IFN- γ .

Il test è fornito in due versioni, con piastra per microtitolazione da 96 pozzetti e con piastra frazionata in 12 strip da 8 pozzetti.

Procedimento:

Le cellule mononucleate del sangue periferico vengono separate dal campione di sangue intero, lavate (per eliminare eventuali citochine adese), contate, opportunamente diluite e seminate nei pozzetti della piastra. L’inoculo risulta pertanto standardizzato. I pozzetti sono prerivestiti con anticorpi monoclonali anti-IFN- γ . Per ciascun campione vengono utilizzati quattro pozzetti:

- controllo negativo per rilevare una reattività citochinica aspecifica;
- contenente antigene ESAT-6;
- contenente antigene CFP-10;
- controllo positivo contenente fitoemoagglutinina.

Il sangue può essere raccolto in provette Vacutainer di vario tipo (Vacutainer CPT citrato di sodio, tubi CPT eparina sodica o tubi standard con eparina); non sono invece utilizzabili provette con EDTA. Il prelievo deve essere mantenuto, fino a un massimo di 8 ore, a temperatura ambiente e non refrigerato; qualora non sia possibile eseguire la separazione dei linfociti entro 8 ore, questa può essere ritardata fino a un massimo di 32 ore aggiungendo alle provette il reagente T-cell Xtend prima di procedere alla separazione stessa.

Se il prelievo è eseguito con tubi CPT, la separazione delle cellule è semplificata, essendo sufficiente centrifugare la provetta. In alternativa è possibile separare i mononucleati su Ficoll.

I linfociti presenti nell'anello vengono recuperati, lavati, contati e quindi diluiti (o concentrati) fino ad ottenere la concentrazione di 2500 cellule/ μ L.

100 μ L di tale sospensione vengono posti nei 4 pozzetti della piastra.

Dopo l'aggiunta dei linfociti, la piastra viene incubata a 37 °C per 16-20 ore per consentire la stimolazione delle cellule T attivate eventualmente presenti. L'IFN- γ prodotto viene catturato dagli anticorpi specifici adesi al pozzetto, mentre le cellule vengono successivamente rimosse mediante lavaggio. Una nuova incubazione con un anticorpo anti-IFN- γ diretto verso un epitopo differente dal precedente e coniugato a fosfatasi alcalina permette, dopo l'aggiunta del substrato, la visualizzazione di uno *spot* di precipitato insolubile nel sito di reazione. Ciascuno *spot* rappresenta l'impronta di una singola cellula reattiva e la conta degli *spot* ottenuti dà la misura della quantità di cellule T reattive presenti. Gli *spot* possono essere contati al microscopio, a piccolo ingrandimento, o con il lettore automatico ELISPOT (AID).

Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore disponibili nella versione su CD.

Interpretazione:

Il test è considerato positivo:

- quando nei pozzetti contenenti gli antigeni ci sono almeno 6 *spot* in più rispetto al pozzetto del controllo negativo, se in quest'ultimo il numero di *spot* è minore o uguale a 6, e ciò indipendentemente dal fatto che il pozzetto contenente mitogeno risulti reattivo. Tuttavia, a causa della variabilità biologica, in presenza di un numero di *spot* superiore al controllo negativo di 5-7 unità, è più prudente considerare il risultato "indeterminato" e ripetere il test;
- quando nei pozzetti contenenti gli antigeni vi è un numero di *spot* almeno doppio di quello del controllo negativo, qualora il controllo negativo presenti da 7 a 10 *spot*, indipendentemente dal fatto che il pozzetto contenente mitogeno risulti reattivo.

Il test è considerato negativo:

- quando il pozzetto con il mitogeno contiene almeno 20 *spot* e non vi è alcuna reazione in nessuno dei pozzetti contenenti gli antigeni.

Il test è considerato indeterminato:

- se il numero degli *spot* presenti nel controllo negativo è superiore a 10;
- a causa della variabilità biologica, in presenza, nei pozzetti con l'antigene, di un numero di *spot* superiore di solo 5-7 unità rispetto al controllo negativo; il test dovrebbe essere ripetuto su un nuovo campione.

Nel caso in cui i pozzetti del controllo positivo e degli antigeni non presentino alcuna reazione, il test deve essere ripetuto per confermare il risultato.

Un risultato positivo indica con elevata probabilità che il campione contiene delle cellule T effettrici reattive a *Mycobacterium tuberculosis*. Essendo gli antigeni ESAT-6 e CFP-10 assenti nei ceppi BCG e nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari, l'unica cross-reattività teoricamente possibile è quella con le infezioni da *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium flavescens* e *Mycobacterium gastri*.

Un risultato negativo indica che il campione probabilmente non contiene cellule T effettrici reattive nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis*.

Un risultato "indeterminato" è spesso correlato a carenze nel sistema immunitario del paziente. Tale evenienza può essere legata anche a un numero di linfociti insufficiente, alla presenza di linfociti stressati a seguito di un trattamento inadeguato del campione o a procedure scorrette di riempimento e/o miscelazione della provetta con mitogeno.

13.3. REFERTAZIONE DEGLI IGRA

Sia che si usi il test QuantiFERON o T-SPOT.TB le indicazioni del produttore consigliano di refertare il risultato in maniera qualitativa:

- QuantiFERON-TB Gold:
 - in caso di risultato positivo: "Infezione da *M. tuberculosis* probabile";
 - in caso di risultato negativo: "Infezione da *M. tuberculosis* non probabile".
- T-SPOT.TB:
 - in caso di risultato positivo: "Presenza di cellule T effettrici reattive a *M. tuberculosis*";
 - in caso di risultato negativo: "Probabile assenza di cellule T effettrici reattive a *M. tuberculosis*".

La maggior parte degli Autori ritiene attualmente che sia opportuno che un risultato positivo del test IGRA venga refertato con il valore numerico delle UI di IFN- γ o come numero di cellule reattive trovate. Il dato quantitativo può infatti essere utile non solo come indice del grado di positività, ma anche per monitorare i singoli test (31). In test seriali, il dato quantitativo permette di valutare la variabilità individuale della risposta immunitaria; non è invece chiaro se un aumento progressivo del valore numerico possa essere interpretato come indice di progressione verso malattia.

13.4. CONCLUSIONI

Gli IGRA sono strumenti diagnostici importanti, permettendo, rispetto all'intradermoreazione di Mantoux, una diagnosi sicuramente più specifica e, secondo numerosi studi, più sensibile, dell'infezione tubercolare latente e, di conseguenza, una prescrizione più mirata della terapia.

I punti relativi ai test IGRA ancora da chiarire e attualmente oggetto di studio sono:

- i valori predittivi positivo e negativo per la diagnosi di LTBI in adulti e bambini;
- il ruolo degli IGRA in soggetti esposti a micobatteri non tubercolari;
- la capacità di discriminare la LTBI recente da quella remota;
- il fenomeno delle conversioni/reversioni;
- l'effetto di eventuali ritardi nell'incubazione del sangue;
- l'accuratezza degli IGRA utilizzati sui liquidi corporei diversi dal sangue;
- l'accuratezza nella diagnosi della tubercolosi extrapolmonare.

BIBLIOGRAFIA

1. Al Attiyah R., Mustafa A.S., Abal A.T., Madi N.M., Andersen P., *Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon-gamma responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy*, 2003, *FEMS Immunol Med Microbiol*; 38:249-256.
2. Andersen P., Munk M.E., Pollock J.M., Doherty T.M., *Specific immune-based diagnosis of tuberculosis*, 2000, *Lancet*; 356:1099-1104.
3. Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO), Società Italiana di Medicina Respiratoria (SIMEr), *Documento sull'utilizzo dei nuovi test immunologici per la diagnosi di infezione tubercolare latente*, 2007, *Rass Patol App Respir*; 22:13-20.
4. Belknap R., Feske M., Choung G., Weinfurter P., Wall K., Graviss E., *Diagnosis of latent tuberculosis infection in U.S. health care workers: reproducibility, repeatability and 6 month follow-up with interferon-gamma release assays (IGRAs)*, 2009, *Am J Respir Crit Care Med*; 179:A4101.
5. Broekmans J.F., Migliori G.B., Rieder H.L., Lees J., Ruutu P., Loddenkemper R., Raviglione M.C., *European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. Recommendations of the World Health Organization (WHO), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) and Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV) Working Group*, 2002, *Eur Respir J*; 19:765-775.
6. Carrara S., Vincenti D., Petrosillo N., Amicosante M., Girardi E., Goletti D., *Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy*, 2004, *Clin Infect Dis*; 38:754-756.
7. Chee C.B., Khinmar K.W., Gan S.H., Barkham T.M., Pushparani M., Wang Y.T., *Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to M. tuberculosis-specific antigens*, 2007, *Am J Respir Crit Care Med*; 175:282-287.
8. Connell T.G., Curtis N., Ranganathan S.C., Buttery J.P., *Performance of a whole blood interferon gamma assay in detecting latent infection with Mycobacterium tuberculosis in children*, 2006, *Thorax*; 61:616-620.
9. Connell T.G., Ritz N., Paxton G.A., Buttery J.P., Curtis N., Ranganathan S.C., *A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children*, 2008, *PLoS One*; 9:3:e2624.
10. Denkinger C.M., Dheda K., Pai M., *Guidelines on interferon- γ release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion?*, 2011, *Clin Microbiol Infect*; 17:806-814.
11. Detjen A.K., Loebenberg L., Grewal H.M.S., Stanley K., Gutschmidt A., Kruger C., Du Plessis N., Kidd M., Beyers N., Walz G., Hesseling A.C., *Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay*, 2009, *Clin Vaccine Immunol*; 16(8):1170-1175.
12. Dewan P.K., Grinsdale J., Kawamura L.M., *Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis*, 2007, *Clin Infect Dis*; 44:69-73.
13. Goletti D., Ferrara G., Bothamley G., Cirillo D., Kampmann B., Lange C., Losi M., Markova R., Migliori G.B., Nienhaus A., Ruhwald M., Wagner D., Zellweger J.P., Huitric E., Sandgren A., Manissero D., *Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis*, 2011, *Eur Respir J*; 37:88-99.

14. Diel R., Loddenkemper R., Nienhaus A., *Predictive value of interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for predicting progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis*, 2012, *Chest*; 142:63-75.
15. Dinnes J., Deeks J., Kunst H., Gibson A., Cummins E., Waugh N., Drobniowski F., Lalvani A., *A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection*, 2007, *Health Technol Assess*; 11:1-196.
16. Dogra S., Narang P., Mendiratta D.K., Chaturvedi P., Reingold A.L., Colford J.M. Jr., Riley L.W., Pai M., *Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India*, 2007, *J Infect*; 54:267-276.
17. European Center for Disease Prevention and Control, *Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis*, 2011, Stockholm.
18. Ferrara G., Losi M., D'Amico R., Roversi P., Piro R., Meacci M., Meccugni B., Dori I.M., Andreani A., Bergamini B.M., Mussini C., Rumpianesi F., Fabbri L.M., Richeldi L., *Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study*, 2006, *Lancet*; 367:1328-1334.
19. Goletti D., Carrara S., Vincenti D., Saltini C., Rizzi E.B., Schinina V., Ippolito G., Amicosante M., Girardi E., *Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting. A pilot study*, 2006, *Clin Microbiol Infect*; 12:550.
20. Goletti D., Parracino M.P., Butera O., Bizzoni F., Casetti R., Dainotto D., Anzidei G., Nisii C., Ippolito G., Poccia F., Girardi E., *Isoniazid prophylaxis differently modulates T-cell responses to RD1-epitopes in contacts recently exposed to Mycobacterium tuberculosis: a pilot study*, 2007, *Respir Res*; 8:5.
21. Herrera V., Perry S., Parsonnet J., Banaei N., *Clinical application and limitations of Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection*, 2011, *Clin Infect Dis*; 52:1031-1037.
22. Hill P.C., Brookes R.H., Fox A., Fielding K., Jeffries D.J., Jackson-Sillah D., Lugos M.D., Owiafe P.K., Donkor S.A., Hammond A.S., Otu J.K., Corrah T., Adegbola R.A., McAdam K.P., *Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection against a gradient of exposure in The Gambia*, 2004, *Clin Infect Dis*; 38:966-973.
23. Liebeschuetz S., Bamber S., Ewer K., Deeks J., Pathan A.A., Lalvani A., *Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study*, 2004, *Lancet*; 364:2196-2203.
24. Machingaidze S., Wiysonge C.S., Gonzalez-Angulo Y., Hatherill M., Moyo S., Hanekom W., Mahomed H., *The utility of an Interferon Gamma release assay for diagnosis of latent tuberculosis infection and disease in children. A systematic review and meta-analysis*, 2011, *Pediatric Infect Dis J*; 30:694-700.
25. Mazurek G.H., Jereb J., Lobue P., Goldberg S., Castro K., *Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection, United States*, 2010, *MMWR Recomm Rep*; 59:1-25.
26. Menzies D., Pai M., Comstock G., *Meta-analysis: new tests for latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research*, 2007, *Ann Intern Med*; 146:340-354.
27. Mori T., *Usefulness of interferon-gamma release assays for diagnosing TB infection and problems with these assays*, 2009, *J Infect Chemother*; 15:143-155.
28. NICE, *Clinical guideline 117 Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*, 2011.

29. Nakaoka H., Lawson L., Squire S.B., Coulter B., Ravn P., Brock I., Hart C.A., Cuevas L.E., *Risk for tuberculosis among children*, 2006, *Emerg Infect Dis*; 12:1383-1388.
30. Nienhaus A., Schablon A., Diel R., *Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB infection – Analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test* *PLoS One*, 2008 Jul; 16;3(7):e2665.
31. Pai M., Kalantri S., Dheda K., *New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis*, 2006, *Expert Rev Mol Diagn*; 6:413-422.
32. Pai M., Menzies D., *Interferon-gamma release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis?*, 2007, *Clin Infect Dis*; 44:74-77.
33. Pai M., Riley L.W., Colford J.M. Jr., *Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review*, 2004, *Lancet Infect Dis*; 4:761-776.
34. Park J.S., Lee J.S. Kim M.Y., Lee C.H., Yoon H.I., Lee S.M., Yoo C.G., Kim Y.W., Han S.K., Yim J.J., *Monthly follow-ups of interferon- γ release assays among healthcare workers in contact with TB patients*, 2012, *Chest*; Epub ahead of print.
35. Richeldi L., Ewer K., Losi M., Bergamini B.M., Millington K., Fabbri L.M., Lalvani A., *T-cell-based diagnosis of neonatal multidrug-resistant latent tuberculosis infection*, 2007, *Pediatrics*; 119:1-5.
36. Richeldi L., Ewer K., Losi M., Bergamini B.M., Roversi P., Deeks J., Fabbri L.M., Lalvani A., *T Cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection following brief exposure*, 2004, *Am J Respir Crit Care Med*; 170:288-295.
37. Ringshausen F.C., Nienhaus A., Costa J.T., Knoop H., Schlösser S., Schultze-Werninghaus G., Rohde G., *Within-Subject Variability of Mycobacterium tuberculosis-Specific Gamma Interferon Responses in German Health Care Workers*, 2011, *Clin Vaccine Immunol*; 18(7):1176-1182.
38. Ringshausen F.C., Nienhaus A., Schablon A., Schlösser S., Schultze-Werninghaus G., Rohde G., *Predictors of persistently positive Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma responses in the serial testing of health care workers*, 2010, *BMC Infect Dis*; 10:220.
39. Sester M., Sotgiu G., Lange C., Giehl C., Girardi E., Migliori G.B., Bossink A., Dheda K., Diel R., Dominguez J., Lipman M., Nemeth J., Ravn P., Winkler S., Huitric E., Sandgren A., Manissero D., *Interferon- γ release assays in the diagnosis of active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis*, 2011, *Eur Respir J*; 37:100-111.
40. Swindells J.E., Aliyu S.H., Enoch D.A., Abubakar I., *Role of interferon-gamma release assays in healthcare workers*, 2009, *J Hosp Infect*; 73:101-108.
41. Tavast E., Salo E., Seppälä I., Tuuminen T., *IGRA tests perform similarly to TST but cause no adverse reactions: pediatric experience in Finland*, 2009, *BMC Res Notes*; 15:2-9.
42. Taylor Z., *What is the epidemiological impact of treatment of latent tuberculosis infection? Tomans's tuberculosis case-detection, treatment and monitoring*, 2004, WHO, Geneva; 226-922.
43. van Zyl-Smit R.N., Zwerling A., Dheda K., Pai M., *Within-subject variability and boosting of T-cell interferon-gamma responses after tuberculin skin testing*, 2009, *Am J Respir Crit Care Med*; 180:49-58.
44. Veerapathran, A., Joshi R., Goswami K., Dogra S., Moodie E.E.M., Reddy M.V.R., Kalantri S., Schwartzman K., Behr M.A., Menzies D., Pai M., *T-cell assays for tuberculosis infection: deriving cut-offs for conversions using reproducibility data*, 2008, *PLoS One*; 3:e1850.

Capitolo 14

LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA

**Claudio Scarparo,
Renato Riva**

14. LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA

Il laboratorio di micobatteriologia costituisce un ambiente di lavoro in cui, per la pericolosità dei materiali processati e per la complessità delle attività che vi si svolgono, deve essere posta una particolare attenzione alla tutela della salute e della sicurezza degli operatori sanitari. Il problema, affrontato dettagliatamente da linee guida internazionali (2), è regolato in Italia dal Decreto Legislativo n. 81 del 9 aprile 2008 (Testo Unico in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro), aggiornato agli accordi del 21 dicembre 2011 in sede di Conferenza Permanente per i Rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano, in vigore dal 26 gennaio 2012, per la formazione dei lavoratori e dei datori di lavoro che svolgono direttamente i compiti di prevenzione e protezione dai rischi.

Tale testo, che raccoglie le direttive riguardanti la sicurezza e i principi base per le misure di prevenzione e di protezione dal rischio di incidenti e infortuni nell'ambiente di lavoro, contiene nel titolo X – *Esposizione agli agenti biologici* – la definizione di agente biologico, la classificazione in quattro gruppi a seconda del rischio di infezione e le norme riguardanti il rischio di esposizione (tab. 1). L'allegato XVLI, che riporta la classificazione degli agenti biologici a seconda dei gruppi, pone i micobatteri nei gruppi 2 o 3. Il gruppo 3 comprende *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (ad eccezione del ceppo BCG), *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium leprae*. Per *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium ulcerans* si specifica che, pur essendo classificati nel gruppo 3, essi possono comportare un rischio di infezione limitato perché normalmente non sono veicolati dall'aria. Sono classificati nel gruppo 2 *Mycobacterium avium/intracellulare*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium xenopi*. Nell'allegato XLVII del decreto suddetto vengono inoltre elencate le specifiche relative alle misure di contenimento rispetto ai gruppi (tab. 2).

Tab. 1 - CLASSIFICAZIONE DEGLI AGENTI BIOLOGICI A SECONDA DEL RISCHIO DI INFEZIONE (D.L. 81/08).

Gruppo 1	Un agente che presenta poche probabilità di causare malattie in soggetti umani
Gruppo 2	Un 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	Un agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e che 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	Un agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani, 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

In caso di dubbio fra due gruppi, l'agente biologico va classificato nel gruppo di rischio più elevato.

Tab. 2 - MISURE DI CONTENIMENTO DEL RISCHIO BIOLOGICO RELATIVE AL LIVELLO DI BIOSICUREZZA 3 (D.L. 81/08, ALLEGATO XLVII).

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	Sì, sull'aria estratta
L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Sì
La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	Raccomandato
Sono richieste specifiche procedure di disinfezione	Sì
La zona di lavoro deve essere mantenuta a una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	Raccomandato
Deve essere effettuato un controllo efficace dei vettori, ad esempio roditori ed insetti	Sì
Superfici idrorepellenti e di facile pulitura	Sì, per il banco di lavoro, l'arredo e il pavimento
Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Sì
Deposito sicuro per agenti biologici	Sì
La stanza deve avere una finestra di ispezione o altro dispositivo che permetta di vederne gli occupanti	Raccomandato
I laboratori devono contenere tutte le attrezzature necessarie	Raccomandato
I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cabine di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori	Sì, quando l'infezione è veicolata dall'aria
Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse di animali	Sì (disponibile)
Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Sì
Trattamento delle acque reflue	Facoltativo

L'alta infettività di *Mycobacterium tuberculosis* è correlata alla bassa dose infettante per l'uomo (50% della dose infettante <10 bacilli). L'incidenza dell'infezione tubercolare nel personale di laboratorio è stimata essere da 3 a 9 volte maggiore di quella relativa a individui che svolgono altre attività lavorative. È stata riportata da Jacobson in uno studio del 1985 un'incidenza annuale di infezione tubercolare, fra personale di laboratorio in Utah, dello 0,3/1000 (6), mentre, in uno studio di Grist, in Gran Bretagna, risulta un'incidenza variabile da 0,035 a 0,56/1000 (5). In un ulteriore studio, condotto da Müller, riguardante 77 laboratori di micobatteriologia, si riporta un'incidenza di infezioni del 26,3/1000, pari a 100 volte la frequenza nella popolazione generale (7).

Studi sulla trasmissione della tubercolosi hanno evidenziato, anche fotograficamente, che numerose goccioline di diverse dimensioni vengono liberate con starnuti o colpi di tosse. Quelle più piccole evaporano con estrema rapidità trasformandosi, in pochi centesimi di secondo, in masse disidratate (*droplet nuclei*) contenenti le sostanze precedentemente in soluzione e le particelle trasportate dalla gocciolina stessa. Le goccioline più grandi di 140 µm, prima di evaporare, si deposita-

no sulle superfici contaminandole e divenendo possibili fonti di infezione attraverso lesioni cutanee o inoculazioni accidentali. I *droplet nuclei* delle goccioline più piccole di 140 μm , una volta evaporate, rimangono nell'aria per lunghissimi periodi di tempo a causa delle loro proprietà aerodinamiche. Le particelle di diametro inferiore a 5 μm , se inalate, possono raggiungere gli alveoli polmonari e dare inizio all'infezione, mentre quelle di diametro superiore vengono rimosse dai meccanismi di difesa della mucosa dell'apparato respiratorio. L'utilizzo di una maschera chirurgica o di un fazzoletto, posti davanti alla bocca e al naso del paziente, minimizza la produzione di *droplet nuclei*, perché il tessuto raccoglie tutte le minuscole goccioline, agglomerandole in una massa fluida, prima che abbiano il tempo di evaporare. Le maschere chirurgiche non sono altrettanto valide per la protezione dall'esposizione (barriera all'inspirazione). Una volta che i *droplet nuclei* si sono formati possono infatti penetrare facilmente le fibre dei tessuti (4, 9).

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 a seguito di contatto diretto con la cute lesa o con le mucose, l'ingestione o l'accidentale inoculo parenterale, che rappresentano invece i principali rischi di laboratorio associati alla manipolazione di materiali o colture contenenti micobatteri non tubercolari.

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

14.1. MODALITÀ DI PENETRAZIONE E ATTIVITÀ LAVORATIVE CHE ESPONGONO AL RISCHIO DI INFEZIONE

Inalazione: attività lavorative che generano aerosol

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

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

Ingestione: attività lavorative correlate alla trasmissione orale

Pipettaggio a bocca. Schizzi di materiale infetto in bocca. Introduzione nella cavità orale delle dita o di materiale contaminato, tramite ingestione di cibo o bevande, applicazione di rossetto, fumo.

Inoculazione: attività correlate a trasmissione venosa

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

Inoculazione: attività correlate alla contaminazione di cute e mucose

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

14.2. PROCEDURE E PRATICHE MICROBIOLOGICHE STANDARD

Una buona conoscenza delle tecniche microbiologiche e delle precauzioni di base universalmente riconosciute sono essenziali per la sicurezza in laboratorio.

Tutti i campioni biologici devono essere considerati infetti e devono pervenire in laboratorio all'interno di un contenitore infrangibile e con tappo a tenuta, possibilmente avvolto in materiale assorbente e inserito in un contenitore esterno rigido, tenendo ben separato il relativo modulo di richiesta.

La movimentazione dei campioni all'interno del laboratorio deve avvenire ponendo i contenitori di materiali biologici, correttamente identificati, all'interno di contenitori secondari che assicurino la posizione verticale del campione. Il personale di laboratorio deve avere una specifica preparazione nella manipolazione di materiali potenzialmente contenenti micobatteri, deve indossare guanti ed eventualmente barriere di protezione facciale per prevenire la possibilità di schizzi di materiale. È doveroso lavarsi le mani dopo aver maneggiato materiali infetti e prima di lasciare il laboratorio.

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

Il laboratorio deve essere tenuto pulito, in ordine e sgombro da qualsiasi oggetto non pertinente al lavoro. Devono essere minimizzate tutte le procedure che possono creare aerosol (vedi 14.1). Le superfici di lavoro e i contenitori di movimentazione interna devono essere decontaminati dopo qualsiasi versamento di materiali potenzialmente pericolosi e comunque 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 i contenitori sono riciclabili, prima di essere sottoposti a lavaggio (soluzione al 10% di ipoclorito di sodio o altro disinfettante adatto). I materiali da eliminare vanno posti in sacche di plastica a tenuta per essere autoclavati o inceneriti. Tali sacche devono essere poste in contenitori rigidi a tenuta, opportunamente contrassegnati con il simbolo di rischio biologico, che possano essere chiusi per essere rimossi dal laboratorio.

14.3. PROCEDURE E PRATICHE MICROBIOLOGICHE SPECIALI

Sulla porta del laboratorio di micobatteriologia deve essere esposto il simbolo internazionale di rischio biologico (fig. 14.1). L'accesso alle aree del laboratorio deve essere limitato alle persone autorizzate. Le porte del laboratorio devono essere tenute chiuse durante il lavoro.

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

Fig. 14.1 - SEGNALETICA (RISCHIO BIOLOGICO).

LABORATORIO BIOLOGICO		
RESPONSABILE DEL LABORATORIO.....		
Agenti biologici utilizzati.....		
.....		
		
RISCHIO BIOLOGICO	DIVIETO DI ACCESSO ALLE PERSONE NON AUTORIZZATE	VIETATO FUMARE O USARE FIAMME LIBERE
NORME DI ACCESSO PER IL PERSONALE AUTORIZZATO:		
- Osservare le disposizioni e le istruzioni impartite		
- Indossare i dispositivi di protezione individuale		
- E' vietato mangiare, bere, conservare cibo, truccarsi, portare anelli e bracciali, indossare calzature aperte		

La fissazione dei vetrini su una piastra riscaldata (65-80 °C per 120-150 minuti) può non uccidere tutti i micobatteri eventualmente presenti sulla superficie del vetrino, che deve quindi essere maneggiato con cura.

In caso di incidente, quale ad esempio il versamento di colture micobatteriche, occorre evacuare immediatamente la stanza chiudendo le porte, cambiare i vestiti, immergendoli in ipoclorito di sodio al 10 %, dopo di che lasciar depositare l'aerosol per almeno 30 minuti. Successivamente è possibile entrare nella stanza, adeguatamente vestiti e dotati di respiratore di tipo FFP3. Occorre ricoprire l'area di versamento con un panno imbevuto di disinfettante, lasciandolo agire per almeno 20 minuti. I disinfettanti raccomandati includono soluzione acquosa di ipoclorito di sodio al 10%, derivati del fenolo al 2,5-5%, alcol isopropilico al 70% o altra soluzione efficace. Per altri disinfettanti commerciali, seguire le istruzioni del produttore (1, 8). La disinfezione della stanza è raccomandata.

È inoltre necessario sporgere denuncia di infortunio sul lavoro e contattare il medico competente per eventuali misure profilattico-terapeutiche. Devono essere disponibili in laboratorio procedure scritte sul comportamento da tenere in caso di incidente. Deve essere tenuta una registrazione scritta di tutti gli incidenti avvenuti in laboratorio.

È consigliabile decontaminare il laboratorio con lampade a raggi ultravioletti e, periodicamente, con opportuni disinfettanti chimici.

Gli strumenti di laboratorio devono essere decontaminati prima dell'intervento dei tecnici addetti alla manutenzione o alla riparazione e prima di essere portati fuori dal laboratorio; se ciò non fosse possibile devono essere contrassegnati con il simbolo di rischio biologico. Devono esistere indicazioni scritte riguardo ai disinfettanti da usare nelle varie situazioni e alla diluizione raccomandata per ciascuno di essi.

Le colture positive per micobatteri tubercolari devono essere eliminate solo dopo essere state sterilizzate in autoclave o devono essere incenerite.

Gli operatori esposti a rischio devono essere sottoposti a una sorveglianza sanitaria da parte del medico competente. Per quanto riguarda l'immunoprofilassi, secondo il DPR 465/2001 (Ob-

bligo alla vaccinazione antitubercolare) la vaccinazione è obbligatoria per il personale sanitario e chiunque, a qualunque titolo, con test tubercolinico negativo, operi in ambienti sanitari ad alto rischio di esposizione a ceppi multifarmacoresistenti oppure che operi in ambienti ad alto rischio e non possa, in caso di cuticonversione, essere sottoposto a terapia preventiva, perché presenta controindicazioni cliniche all'uso di farmaci specifici. Si raccomanda la terapia dell'infezione tubercolare latente qualora si rilevi cuticonversione.

14.4. EQUIPAGGIAMENTO DI BIOSICUREZZA RACCOMANDATO

Il datore di lavoro e/o il direttore del laboratorio, il responsabile della sicurezza, il medico competente e i dirigenti devono informare gli operatori dei rischi specifici ai quali sono esposti e istruirli al rispetto delle misure di sicurezza; devono inoltre assicurare la fornitura di strutture, strumentazioni e materiali adeguati e devono sorvegliare sul loro corretto utilizzo. Deve essere disponibile un manuale operativo 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. Devono essere prodotte con materiali impermeabili ai liquidi, resistenti alla corrosione e avere determinati requisiti strutturali, quali essere prive di punte e spigoli taglienti e di parti in movimento non protette; progettate, costruite e installate in modo da garantire semplicità d'uso, di manutenzione, di pulizia e di decontaminazione.

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

L'esposizione ad agenti biologici in laboratorio è molto spesso dovuta a errore umano, per inesperienza, disinformazione, distrazione o eccessiva confidenza con il materiale biologico da parte dell'operatore. Tali errori compromettono spesso l'efficacia delle migliori misure di sicurezza e delle stesse apparecchiature appositamente destinate alla protezione dell'operatore.

Sono oggi disponibili conoscenze tecniche e strumenti che consentono di prevenire la maggior parte delle infezioni in laboratorio.

Cappe di sicurezza biologica a flusso laminare tipo II devono essere usate ogni qualvolta si eseguono operazioni che possono liberare aerosol, ivi comprese l'apertura di contenitori dopo centrifugazione, la miscelazione, l'agitazione, il rimescolamento vigoroso o la sonicazione e l'apertura di contenitori di materiali infetti, in cui la pressione possa essere superiore a quella dell'ambiente circostante. La griglia sul piano di lavoro della cabina di sicurezza non deve essere ostruita da fogli, teli o apparecchiature, si possono infatti formare vortici pericolosi per l'operatore. Le cappe di sicurezza proteggono dall'aerosol ma non dalla contaminazione cutanea. Per ogni cappa di sicurezza deve essere previsto un programma periodico di disinfezione, manutenzione e sostituzione dei filtri, e tutto deve essere registrato in apposite schede.

L'utilizzo razionale della cappa a flusso laminare prevede di:

- ridurre al minimo il materiale sul piano di lavoro, posizionandolo verso il fondo;
- eseguire tutte le operazioni nella zona centrale o verso il fondo del piano di lavoro;
- evitare movimenti bruschi all'interno della cappa.

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

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

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

Per conservare campioni e colture devono essere impiegati contenitori con tappo a vite.

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

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

Respiratori di tipo FFP3 devono essere a disposizione per l'eventualità che si formino aerosol.

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

14.5. STRUTTURA DEL LABORATORIO

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

Fondamentalmente in un laboratorio di micobatteriologia i rischi di contagio derivano dalla possibilità di inalare particelle (*droplet nuclei*) infette. Un'efficace riduzione della concentrazione di *droplet nuclei* infetti può essere ottenuta solo con un rigoroso controllo dei ricambi di aria ambiente nelle stanze di micobatteriologia.

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

La zona filtro, oltre a impedire il flusso dell'aria dalle stanze di micobatteriologia verso il restante reparto, dovrà essere convenientemente attrezzata onde permettere al personale sanitario di indossare protezioni individuali prima di accedere agli ambienti pertinenti alla micobatteriologia.

Pur non esistendo requisiti specifici per la ventilazione, questa dovrebbe essere tale da consentire diversi ricambi di aria ogni ora, con temperature tra 20 e 23 °C e umidità del 50-60%. Dovrebbe

essere possibile l'estrazione terminale dell'aria e lo scarico all'esterno dopo averla filtrata mediante filtri HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*). Qualora non sia disponibile l'aerazione meccanica, le finestre devono essere apribili e preferibilmente dotate di reti contro gli insetti. In tal caso la pressione negativa può essere ottenuta con l'impiego di efficaci aspiratori a parete che espellano l'aria della stanza direttamente verso l'esterno dell'edificio.

Non esistendo nella legislazione italiana alcun riferimento utile alla realizzazione di un idoneo sistema di ventilazione e/o di pressione negativa, si può far riferimento alle linee guida dei CDC (2).

Un sistema di ventilazione/condizionamento dell'aria in grado di minimizzare il rischio di contagio per le persone che devono accedere al settore di micobatteriologia e contemporaneamente di minimizzare il rischio di diffusione di *droplet nuclei* verso le restanti zone del laboratorio può essere attuato solo abbinando la pressione negativa a un frequente ricambio di tutta l'aria ambiente, realizzato con l'impiego di filtri HEPA in grado di trattenere particelle di dimensioni $\geq 0,3 \mu\text{m}$.

Nell'abbattimento dei contaminanti aerotrasportati mediante il ricambio dell'aria, il tempo necessario è direttamente proporzionale all'aumento di efficienza desiderato (tab. 3). Ad esempio, con 20 ricambi orari, per passare da un'efficienza del 99% a una del 99,9%, il tempo necessario raddoppia (da 7 a 14 minuti). Occorre pertanto raggiungere un giusto compromesso, da valutare secondo le caratteristiche di ogni realtà, tra efficienza di abbattimento e numero di ricambi per ora.

Tab. 3 - RICAMBI ARIA PER ORA (RAO) E TEMPO NECESSARIO PER RIMUOVERE CONTAMINANTI AEROTRASPORTATI CON UN'EFFICIENZA DEL 99% E DEL 99,9%.

RAO	Tempo necessario (minuti)	
	efficienza 99%	efficienza 99,9%
2	138	207
4	69	104
6	46	69
12	23	35
15	18	28
20	7	14
50	3	6
400	<1	1

Per ridurre al minimo i rischi di contagio all'interno del settore di micobatteriologia è necessario che tutta l'aria presente all'interno dello stesso venga cambiata almeno 6 volte all'ora. È altrettanto utile che l'aria venga fatta circolare nella stanza per eliminare zone di possibile ristagno. A tal fine si possono utilizzare due tipi di flussi (fig. 14.2):

- aspirazione nella parte bassa ai lati opposti della stanza e immissione nella parte alta (preferibile nella maggior parte dei casi);
- aspirazione su di un lato, a differenti altezze, e immissione dal lato opposto, curandone la diffusione/miscelazione. L'aria circolante in tale sistema dovrebbe essere filtrata con filtri HEPA in grado di trattenere il 99,97% delle particelle di diametro fino a $0,3 \mu\text{m}$.

Se tale impianto è abbinato a un'aspirazione verso l'esterno si realizza contemporaneamente anche la pressione negativa; a tale scopo occorrerà prevedere, a valle del filtro HEPA, un aspiratore ausiliario in grado di intercettare ed espellere verso l'esterno un volume d'aria pari almeno al 10% dell'aria circolante nel sistema chiuso di filtrazione.

L'esistenza di una differenza di pressione tra l'esterno e l'interno della stanza deve essere verificata periodicamente. A tale scopo è sufficiente collocare sul pavimento, esternamente alla stanza e a circa 5 cm dalla porta, un generatore di fumo. Il fumo prodotto dovrà essere aspirato sotto la battente della porta e disperso nella stanza.

L'immissione nell'atmosfera di aria proveniente da un laboratorio di micobatteriologia dovrà esser fatta in modo da evitare il ricircolo di *droplet nuclei* infetti attraverso impianti di condiziona-

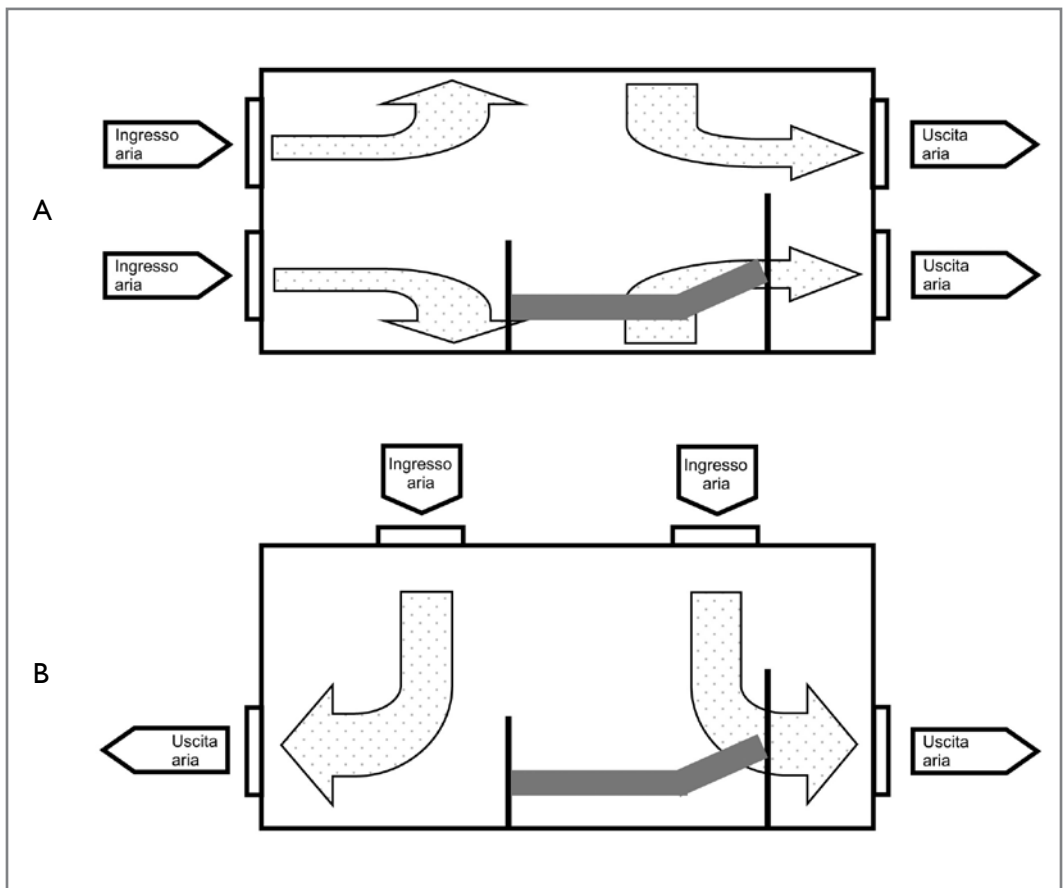


Fig. 14.2 - SCHEMA DI AMBIENTI CON CIRCOLAZIONE D'ARIA PROGETTATA IN FUNZIONE DI UNA BUONA MISCELAZIONE, PREVENENDO UN PASSAGGIO DIRETTO DALLE BOCCHETTE DI IMMISSIONE A QUELLE DI ASPIRAZIONE. L'ARIA IN USCITA PUÒ ESSERE ESPULSA ALL'ESTERNO OPPURE RICICLATA PREVIO PASSAGGIO ATTRAVERSO UN FILTRO HEPA.

mento o finestre aperte. Il vento che soffia su un edificio crea una circolazione di aria turbolenta, in special modo nella fase discendente, impedendo di fatto una veloce dispersione dell'aria estratta; tale aria forma vortici in vicinanza delle pareti con conseguente rischio di reimmissione nell'ambiente interno (fig. 14.3). Le tubature di estrazione dell'aria da laboratori di micobatteriologia non dotati di filtri HEPA dovranno pertanto essere posizionati al di sopra della zona di turbolenza.

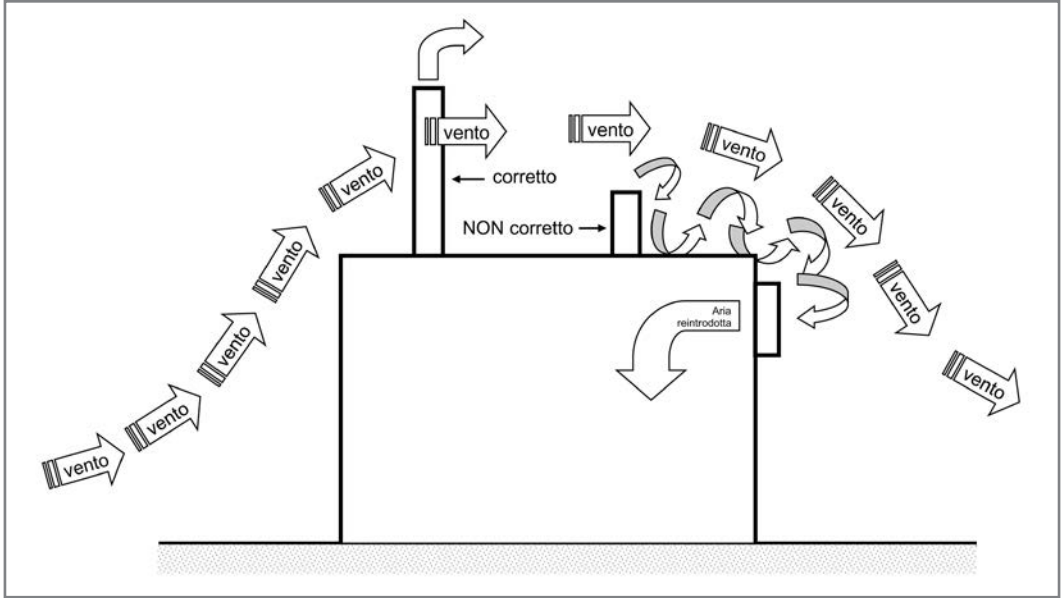


Fig. 14.3 - ZONA DI POSSIBILE RICIRCOLO DELL'ARIA ESPULSA A CAUSA DI VORTICI CREATI DAL VENTO AL DI SOPRA DELL'EDIFICIO. L'ALTEZZA DELLA ZONA DI POSSIBILE RICIRCOLO DELL'ARIA ESPULSA VARIA A SECONDA DELLA FORMA DELL'EDIFICIO E DELLA VELOCITÀ DEL VENTO. L'ALTEZZA DEL CAMINO DI ESPULSIONE DELL'ARIA INTERNA DEVE TENER CONTO DI TALI PARAMETRI, SCARICANDO AL DI SOPRA DI TALI ZONE, ONDE PREVENIRE UNA POSSIBILE REINTRODUZIONE DELL'ARIA ESPULSA.

Se in un laboratorio di micobatteriologia realizzato prevedendo l'impiego della pressione negativa si hanno più ambienti di lavoro (tipicamente: ricevimento del materiale, preparazione dei campioni, centrifugazione, colorazione dei vetrini per microscopia, incubazione dei campioni su terreni solidi e liquidi, microscopia e identificazione genetica dei micobatteri), fatto salvo l'obbligo di idonee attrezzature e di un percorso obbligato dall'ingresso all'uscita sia per il personale sia per il materiale, la suddivisione di tali ambienti potrebbe essere realizzata (impiegando tecnologie attualmente disponibili) mediante l'impiego di "porte virtuali" (fig. 14.4) generate da flussi laminari verticali che permettono il movimento di persone e materiali senza l'uso di porte fisiche. Tali flussi laminari possono essere dotati di filtri HEPA per garantire anche una suddivisione tra i diversi ambienti da possibili inquinamenti incrociati. Le porte virtuali permettono il movimento del personale tra i vari ambienti senza la necessità di aprire fisicamente le eventuali porte di separazione (maggiore sicurezza nel trasporto del materiale) e inoltre consentono la totale visualizzazione senza ostacoli.

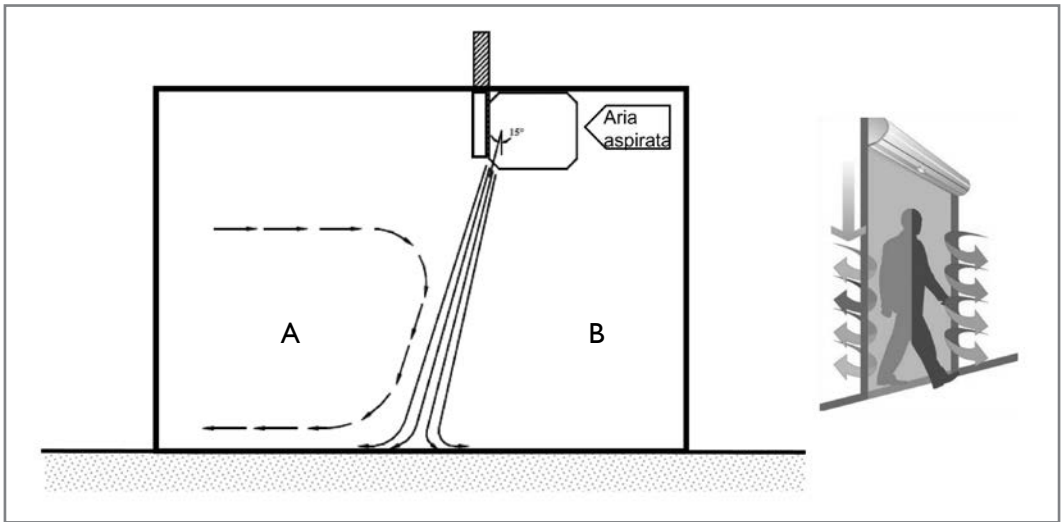


Fig. 14.4 - PORTA VIRTUALE. L'ARIA ASPIRATA DALL'AMBIENTE VIENE RIEMESSA SOTTO FORMA DI FLUSSO LAMINARE VERTICALE CHE MANTIENE SEPARATE LE AREE A E B.

14.6. MISURE DI DISINFEZIONE E STERILIZZAZIONE

14.6.1. DISINFEZIONE

Processo che riduce o elimina completamente tutti i microrganismi patogeni ad eccezione delle spore. La possibilità che un oggetto che è stato disinfettato in modo appropriato sia in grado di trasmettere microrganismi patogeni è fortemente ridotta.

14.6.2. STERILIZZAZIONE

Procedura fisica o chimica in grado di eliminare o distruggere completamente tutte le forme di vita microbica.

14.6.2.1. STERILIZZAZIONE FISICA

Calore umido (autoclave). Il vapore acqueo saturo sotto pressione è il più efficace e il principale agente sterilizzante utilizzato nei laboratori di microbiologia clinica. Per la routinaria sterilizzazione di terreni di coltura e materiali termostabili di laboratorio (provette, contenitori vari, piccoli strumenti), il tempo di esposizione è di 15 minuti a 121 °C a 1 atmosfera di pressione.

Per la sterilizzazione di rifiuti infetti, colture micobatteriche o altri microrganismi, il tempo di esposizione a 121 °C è solitamente aumentato a 30-60 minuti. Il contatto diretto del vapore è una condizione critica per la sterilizzazione, occorre perciò adottare tutte le misure che facilitano la penetrazione del vapore nel carico di materiale infetto. L'uso di autoclavi sottovuoto consente di trattare i materiali di rifiuto a 132 °C, e alla pressione di due atmosfere, riducendo il tempo di sterilizzazione a 10-20 minuti.

Incenerimento. Rappresenta il metodo più usato per il trattamento dei rifiuti ospedalieri. Esistono diverse configurazioni per le camere di combustione; la temperatura nella camera primaria deve essere di almeno 870-980 °C e quella nella camera secondaria di almeno 1000 °C. Il tempo di ritenzione del gas nella camera secondaria deve essere di almeno 0,5 secondi.

Filtrazione. La filtrazione è un processo che rimuove microrganismi e particelle microscopiche da una soluzione, utilizzando delle membrane di acetato o nitrato di cellulosa con pori di 0,22 µm. Una comune applicazione dei metodi di filtrazione è la sterilizzazione dell'aria e dei gas. Filtri HEPA sono usati nelle cappe di sicurezza biologica e per filtrare l'aria delle stanze. Alcune riserve sono state avanzate circa l'efficacia della filtrazione nei confronti del virus.

Radiazioni ultraviolette (UV). Sono radiazioni elettromagnetiche a cui i microrganismi sono altamente sensibili. L'efficacia delle radiazioni UV dipende dall'intensità della radiazione, dalla distanza dell'oggetto dalla fonte UV, dall'umidità relativa e dalla specie microbica. Il principale svantaggio dell'uso delle radiazioni UV come mezzo di sterilizzazione è costituito dalla loro incapacità di penetrare i materiali biologici. Per essere inattivato, il microrganismo deve essere direttamente esposto alle radiazioni UV. Il metodo è quindi utilizzabile per la sterilizzazione di organismi presenti nell'aria e su superfici.

Radiazioni ionizzanti. Microonde, raggi gamma, raggi X ed elettroni sono utilizzati prevalentemente a livello industriale.

14.6.2.2. STERILIZZAZIONE CHIMICA IN FASE LIQUIDA

Acido peracetico. È un agente ossidante con azione sporicida utilizzabile da solo o in combinazione con perossido di idrogeno. Può essere impiegato allo 0,2% per sterilizzare, tramite immersione, strumenti diagnostici e chirurgici. È attivo in presenza di sostanze organiche e non è tossico.

Glutaraldeide 2-5%. È utilizzata per materiale medico o chirurgico che non possa essere sterilizzato mediante il calore o le radiazioni.

Polifenoli. I derivati fenolici sono principalmente usati per la decontaminazione di materiale inquinato e di strumentario. La soluzione diluita è stabile per 10 giorni. I polifenoli sono inattivati in modo modesto dal materiale organico.

14.6.2.3. STERILIZZAZIONE CHIMICA IN FASE GASSOSA

Le caratteristiche dei singoli disinfettanti sono riportate in tabella 4.

Ossido di etilene. L'azione mutagena e cancerogena ne riducono molto l'impiego in ambito ospedaliero. È usato per materiali che non sopportano le alte temperature e l'eccessiva umidità.

Vapori di formaldeide. Vengono usati nei laboratori per sterilizzare i filtri HEPA nelle cappe di sicurezza biologica, le stanze o le apparecchiature contaminate. Si può riscaldare la paraformaldeide (10,8 g/m³) o bollire la formalina (35 mL/m³) dopo aver sigillato porte e finestre. In alternativa alla procedura di riscaldamento si può mescolare la formaldeide con due parti di permanganato di potassio; dopo aggiunta di acqua la miscela bolle vigorosamente e libera formaldeide. La temperatura di fumigazione deve essere >23 °C e l'umidità relativa del 70%. Il gas deve rimanere a contatto con le superfici almeno 8-24 ore. È poi indispensabile aerare la stanza. La formaldeide è cancerogena.

Perossido di idrogeno. Può essere usato, vaporizzato, per la disinfezione di cappe di sicurezza biologica e della superficie di strumentazioni medico-chirurgiche. Una soluzione acquosa di perossi-

do di idrogeno al 30% viene introdotta in un vaporizzatore a 55-60 °C per 90 minuti. Non produce sostanze tossiche ma è corrosivo per alcuni metalli, per la gomma e il nylon.

Iodofori. Diversamente dal cloro, lo iodio esplica la sua azione microbica allo stato molecolare. Gli iodofori sono dei complessi labili di iodio elementare o di triioduro con una molecola organica ad alto peso molecolare (che funziona da trasportatore) in grado di rilasciare gradualmente lo iodio. Gli iodofori possono essere erogati mediante appositi atomizzatori e usati per la disinfezione ambientale.

Tab. 4 - DISINFETTANTI, DILUIZIONI D'USO E PROPRIETÀ RELATIVE ALL'IMPIEGO VERSO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Disinfettante	Diluizione d'uso (in H ₂ O)	Attività verso <i>M. tuberculosis</i>	Caratteristiche ^a							
			A	B	C	D	E	F	G	H
Alcol isopropilico	60-95%	Intermedia	+	+/-	-	+	+/-	+	-	+
Perossido di idrogeno	3-25%	Alta	+	-	-	+/-	+	+	-	+
Formaldeide	3-8%	Intermedia/alta (secondo diluizione)	+	-	+	-	+	+	+	+
Composti di ammonio quaternario	0,4-1,6%	Bassa	+	-	-	+	+	+	-	+
Composti fenolici	0,4-5%	Bassa/intermedia (secondo diluizione)	+	-	+	+/-	+	+	-	+
Cloroderivati	10.000 ppm di cloro libero	Bassa/alta (secondo diluizione)	+	+	+	+	+	+	+	+
Iodofori	30-50 ppm di iodio libero	Intermedia	+	+/-	+	+	+/-	+	-	+
Glutaraldeide	2%	Alta	+	-	+	-	+	+	+	+

^a A, attivo a distanza di una settimana dalla preparazione; B, corrosivo; C, attività residua; D, inattivabile da sostanze organiche; E, irritante per la pelle; F, irritante per gli occhi; G, irritante per le vie respiratorie; H, tossico.

BIBLIOGRAFIA

1. Best M., Sattar S.A., Springthorpe V.S., Kennedy M.E., *Efficacies of selected disinfectants against Mycobacterium tuberculosis*, 1990, *J Clin Microbiol*; 28:2234-2239.
2. CDC, *Goals for working safely with Mycobacterium tuberculosis in clinical, public health, and research laboratories*, 1997, <http://www.cdc.gov/od/ohs/TB/tbdoc.htm>.
3. CDC, *Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care settings*, 2005, *MMWR*; 54:1-141.
4. Gilchrist M., *Biosafety precautions for airborne pathogens*, in: Fleming D.O., Richardson J.H., Tulis J.I., Vesley D. Ed., *Laboratory safety. Principles and practices*, 1995, American Society for Microbiology, Washington DC; 67-76.
5. Grist N.R., Emslie J.A.N., *Association of clinical pathologists' survey of infection in British clinical laboratories, 1970-1989*, 1993, *J Clin Pathol*; 47:391-394.
6. Jacobson J.T., Orlob R.B., Clayton J.L., *Infections acquired in clinical laboratories in Utah*, 1985, *J Clin Microbiol*; 21:486-489.
7. Müller H.E., *Laboratory acquired mycobacterial infection*, 1988, *Lancet*; ii:331.
8. Rutala W.A., *Disinfection, sterilization, and waste disposal*, in: Wenzel R.P. Ed., *Prevention and control of nosocomial infections*, 1997, The Wilson & Wilkins Co., Baltimore; 539-593.
9. Sewell D.L. *Laboratory-associated infections and biosafety*, 1995, *Clin Microbiol Rev*; 8:398-405.

Capitolo 15

ORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI MICOBATTERIOLOGIA

Claudio Scarparo

15. ORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI MICOBATTERIOLOGIA

15.1. GENERALITÀ

Anche in un Paese a bassa prevalenza come l'Italia, la tubercolosi ha assunto negli ultimi anni un ruolo emergente e sta diventando uno dei più importanti problemi di salute pubblica.

In questo contesto diviene prioritario predisporre un efficace piano per il controllo della malattia tubercolare che si fondi sui seguenti capisaldi:

- prevenzione;
- diagnosi precoce;
- trattamento adeguato e tempestivo;
- follow-up del paziente;
- sorveglianza delle resistenze;
- sorveglianza epidemiologica.

Il laboratorio di micobatteriologia interviene in modo determinante nel realizzare pienamente tutti i punti sopra menzionati, consentendo:

- la prevenzione, sia con l'individuazione tempestiva (mediante l'esame microscopico dell'escreato) dei pazienti contagiosi da isolare, sia con l'identificazione (usando i nuovi test immunologici) dei pazienti da sottoporre a terapia dell'infezione tubercolare latente;
- una diagnosi precoce mediante l'identificazione del bacillo tubercolare, sia utilizzando tecniche di biologia molecolare direttamente sul campione clinico, sia mediante l'isolamento in coltura;
- una terapia adeguata fornendo al clinico nel minor tempo possibile i dati di sensibilità relativi ai farmaci antitubercolari;
- un corretto follow-up del paziente, monitorando l'efficacia della terapia mediante esami microscopici e colturali di controllo;
- la sorveglianza delle resistenze, saggiando la sensibilità dei ceppi tubercolari di primo isolamento e di quelli isolati in corso di trattamento, nel caso di fallimento terapeutico;
- la sorveglianza epidemiologica, tramite la sistematica trasmissione alle strutture territoriali competenti dei dati riguardanti gli accertamenti microbiologici eseguiti.

15.2. GLI STANDARD DI RIFERIMENTO

I principali organismi internazionali ritengono necessaria, per i Paesi a bassa incidenza di tubercolosi, la centralizzazione delle procedure diagnostiche in un numero limitato di laboratori (3).

15.2.1. GLI STANDARD DIAGNOSTICI

Secondo le indicazioni dell'American Society for Microbiology solo i laboratori caratterizzati da un elevato volume di lavoro dovrebbero eseguire la diagnostica dei micobatteri. La qualità delle prestazioni è infatti strettamente legata all'esperienza professionale degli operatori, esperienza che si può acquisire e mantenere soltanto con un'attività continuativa su un adeguato numero di campioni.

La tabella 1 riporta, per alcuni dei principali test diagnostici, i carichi minimi di lavoro raccomandati (8).

Tab. 1 - CARICHI MINIMI DI LAVORO RACCOMANDATI.

Indagine	Quantità
Esame microscopico	15-20 a settimana
Esame colturale	20 a settimana
Test di sensibilità ai farmaci di prima scelta	50 all'anno

Nel 1993 e nel 2005, i Centers for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta hanno emanato importanti raccomandazioni riguardanti i test da impiegare nella diagnostica delle infezioni da micobatteri e i tempi massimi (*turnaround time*) entro cui fornire al clinico i relativi referti (4, 6, 12). Le tabelle 2 e 3 sintetizzano i parametri qualitativi a cui è necessario adeguarsi per produrre risultati laboratoristici di effettiva utilità clinica. Anche in Italia le associazioni scientifiche e il Ministero della Salute hanno pubblicato documenti tecnici che forniscono informazioni esaustive per una corretta diagnostica delle infezioni da micobatteri (9, 10).

L'adozione di tecnologie innovative, frutto delle più recenti conoscenze scientifiche, pur comportando un investimento finanziario, determina una diminuzione dei costi di gestione del paziente conseguente alla tempestività di diagnosi e terapia.

Tab. 2 - TECNICHE CONSIGLIATE PER LE PRINCIPALI INDAGINI DIAGNOSTICHE.

Indagine	Tecnica di riferimento
Microscopia per bacilli alcol-acido-resistenti	Colorazione con fluorocromi dopo centrifugazione
Amplificazione per <i>M. tuberculosis</i> complex	Presenza del controllo interno di amplificazione
Esame colturale	Associazione di terreno liquido e solido
Identificazione	Sonde genetiche o sequenziamento genico
Test di sensibilità ai farmaci di prima scelta	Metodo delle proporzioni in terreno liquido

Tab. 3 - INDAGINI DIAGNOSTICHE E RELATIVI OBIETTIVI TEMPORALI DI REFERTAZIONE RACCOMANDATI.

Indagine	Tempo di refertazione
Microscopia per bacilli alcol-acido-resistenti	24 h
Amplificazione per <i>M. tuberculosis</i> complex	48 h
Esame colturale (positivo)	14 gg
Identificazione	21 gg
Test di sensibilità ai farmaci di prima scelta	30 gg
Test di sensibilità ai farmaci di seconda scelta	28 gg da quando il ceppo è stato riconosciuto essere MDR o dalla richiesta

15.2.2. GLI STANDARD DI SICUREZZA

Il laboratorio di micobatteriologia costituisce un ambiente di lavoro in cui, per la pericolosità dei materiali processati e per la complessità delle attività che vi si svolgono, deve essere posta una particolare attenzione alla tutela della salute e alla sicurezza degli operatori sanitari.

Nel 1995 i CDC hanno emanato una proposta di linee guida riguardante i requisiti strutturali, le dotazioni strumentali e i dispositivi di protezione individuale ritenuti indispensabili per garantire condizioni di sicurezza nei laboratori di micobatteriologia (5).

Tali indicazioni sono state in gran parte raccolte ed elaborate nel Decreto Legislativo n. 81 del 9 aprile 2008 (1), che fissa le direttive in materia di sicurezza del lavoro, specificando i principi base e le misure di prevenzione e di protezione da adottare in ambito lavorativo. Nel titolo X, che contiene valutazioni riguardanti l'esposizione ad agenti biologici, *Mycobacterium tuberculosis* è classificato nel gruppo 3 quale agente in grado di causare malattia grave e di costituire un serio rischio per la salute dei lavoratori e vengono definiti gli elementi essenziali per predisporre un livello di biosicurezza 3. In particolare, nell'allegato XLVII (tab. 4) vengono elencate le specifiche per le misure di contenimento del rischio riguardanti l'idoneità strutturale degli ambienti di lavoro.

Tab. 4 - MISURE DI CONTENIMENTO DEL RISCHIO BIOLOGICO RELATIVE AL LIVELLO DI BIOSICUREZZA 3.

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	Sì, sull'aria estratta
L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Sì
La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	Raccomandato
Specifiche procedure di disinfezione	Sì
La zona di lavoro deve essere mantenuta a una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	Raccomandato
Controllo efficace dei vettori, ad esempio roditori e insetti	Sì
Superfici idrorepellenti e di facile pulitura	Sì, per il banco di lavoro, l'arredo e il pavimento
Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Sì
Deposito sicuro per agenti biologici	Sì
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	Sì, quando l'infezione è veicolata dall'aria
Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse di animali	Sì (disponibile)
Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Sì
Trattamento delle acque reflue	Facoltativo

Per quanto riguarda l'immunoprofilassi, secondo il DPR 465/2001 (obbligo alla vaccinazione anti-tubercolare) la vaccinazione è obbligatoria per il personale sanitario con test tubercolinico negativo che operi in ambienti sanitari ad alto rischio di esposizione a ceppi multifarmacoresistenti oppure che operi in ambienti ad alto rischio e non possa, in caso di cuticonversione, essere sottoposto a terapia preventiva, perché presenta controindicazioni cliniche all'uso di farmaci specifici.

15.2.3. GLI STANDARD ORGANIZZATIVI

L'acquisizione e il mantenimento degli standard diagnostici e di sicurezza precedentemente illustrati dipendono in gran parte dall'organizzazione del laboratorio. Un moderno management dovrebbe prevedere:

- personale dirigente esclusivamente dedicato, con curriculum formativo in microbiologia clinica ed esperienza lavorativa e scientifica nel settore della micobatteriologia;
- personale tecnico esclusivamente dedicato con esperienza lavorativa in microbiologia;
- corsi di specifica e continua formazione di tutto il personale;
- presenza di istruzioni operative scritte;
- adozione di metodi diagnostici standardizzati;
- adesione a programmi di controllo di qualità;
- trasmissione tempestiva dei referti;
- valutazione periodica dei carichi di lavoro e delle performance del laboratorio;
- adesione agli standard di sicurezza, per quanto riguarda requisiti strutturali, attrezzature di lavoro e dispositivi di protezione individuale;
- manuale di biosicurezza;
- raccolta ed elaborazione dei dati a fini epidemiologici;
- monitoraggio delle resistenze ai farmaci antitubercolari.

Un ulteriore rilevante aspetto dell'organizzazione dei laboratori di micobatteriologia riguarda la scelta del sistema informatico. La comunicazione dei risultati laboratoristici non può prescindere dall'interconnessione dei diversi sistemi informatici intra- ed extra-ospedalieri e dalla necessità di stabilire standard omogenei per il trasferimento, l'analisi e il confronto dei dati. Non a caso, il piano per il controllo della tubercolosi elaborato dai CDC introduce, nella parte dedicata ai laboratori, il concetto di *system approach*, da realizzarsi attraverso il collegamento in rete del maggior numero possibile di laboratori (7).

15.2.4. CLASSIFICAZIONE DEI LABORATORI

In accordo con le raccomandazioni della letteratura internazionale (3, 8), il Supplemento n. 35 alla GU n. 40, 1999 (2) propone una classificazione dei laboratori, ripresa dalla Lettera Circolare del Ministero della Salute del 2004 (10), articolata su tre livelli di attività, tenendo presente che esistono dei requisiti minimi indispensabili per poter svolgere determinati tipi di diagnostica:

- 1° livello o laboratorio di base: esame microscopico;
- 2° livello o laboratorio regionale: esame microscopico, esame colturale, test standardizzati di diagnostica molecolare direttamente su campione clinico, identificazione e antibiogramma relativo a farmaci di prima linea dei ceppi appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex. Bacino di utenza di circa un milione di abitanti;

- 3° livello o laboratorio di riferimento: attività dei livelli precedenti, identificazione a livello di specie nell'ambito del *Mycobacterium tuberculosis* complex, antibiogramma, inclusi i farmaci di seconda linea quando necessari, identificazione dei micobatteri non tubercolari e relativo antibiogramma quando appropriato, conservazione dei ceppi, tipizzazione molecolare per indagini epidemiologiche, valutazione e acquisizione di tecnologie avanzate, attività di coordinamento con altri laboratori per il controllo di qualità e la formazione del personale.

Bacino di utenza 5-10 milioni di abitanti.

I laboratori di 1° o 2° livello sono tenuti a inviare campioni o ceppi al laboratorio di livello superiore per le indagini non di loro spettanza.

Il frazionamento delle varie attività e delle rispettive responsabilità della diagnostica micobatterologica fra i diversi settori di un laboratorio generale (amplificazioni eseguite dal settore di biologia molecolare, test immunologici eseguiti dal settore di sierologia, ecc.) non è considerata oggi scelta operativa ottimale.

15.3. LA SITUAZIONE DEI LABORATORI IN ITALIA

Nel 2004 il Gruppo di Lavoro Micobatteri dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) ha pubblicato i dati di un'indagine conoscitiva condotta nel triennio 1999-2001 (11) riguardante l'attività diagnostica dei laboratori di micobatteriologia di 335 ospedali uniformemente distribuiti sul territorio nazionale. Da tale studio sono emerse numerose e serie perplessità riguardo al livello qualitativo complessivo delle prestazioni diagnostiche. Risulta infatti che:

- la maggioranza dei laboratori esegue un numero di esami largamente inferiore al minimo raccomandato;
- le metodologie diagnostiche utilizzate non sono uniformi, rendendo i risultati scarsamente confrontabili;
- alcuni laboratori eseguono indagini non previste dal livello diagnostico a cui appartengono;
- i flussi informativi sono inadeguati.

Si è riscontrato inoltre come una buona parte dei laboratori non sia a norma di legge per quanto concerne la sicurezza dei lavoratori.

Da questo studio emerge chiaramente quanto sia urgente nel nostro Paese un riordino dei servizi di laboratorio. È necessario enfatizzare i concetti di razionalizzazione e concentrazione della diagnostica dei micobatteri ai fini di superare la polverizzazione dei servizi attualmente in atto. Tale progetto, attualmente ostacolato da numerosi fattori quali, ad esempio, scarso coordinamento tra gli operatori del settore e insufficiente copertura economica, va comunque tenacemente perseguito.

15.4. IL RIORDINO DEI LABORATORI IN ITALIA

Il riordino dei laboratori di diagnostica micobatterologica per livello di attività sarebbe in grado di offrire all'intera comunità nazionale una più equa e omogenea prestazione diagnostica, garantendo in maniera progressiva tutto lo spettro di procedure diagnostiche, dalla più semplice alla più sofisticata, rispondenti a criteri di qualità ben definiti (7).

Verrebbero infatti garantiti:

- un'uniforme qualità del servizio diagnostico, a prescindere da quale sia il livello del laboratorio a cui il cittadino si rivolge in prima istanza. Il concetto di equità di accesso alla struttura sanitaria per l'utente presuppone infatti la garanzia di risposte uniformi in qualsiasi punto del sistema avvenga l'accesso;
- razionalizzazione delle risorse economiche e umane disponibili;
- volumi di lavoro adeguati a ciascun livello di laboratorio per garantire un'elevata qualità diagnostica;
- standardizzazione, affidabilità e rapidità delle prestazioni;
- elevati livelli di sicurezza per gli operatori;
- miglioramento della sorveglianza epidemiologica della tubercolosi.

15.4.1. LE INIZIATIVE DELLE REGIONI

Negli ultimi anni alcune Regioni, in virtù delle norme che devolvono loro ampie competenze in materia di Sanità, hanno approvato linee guida riguardanti la tubercolosi e la diagnostica dei micobatteri (Basilicata, Calabria, Campania, Lombardia, Marche, Piemonte, Puglia, Toscana, Umbria, Veneto) (tab. 5). È auspicabile che tali esempi vengano seguiti quanto prima da tutte le altre Regioni e che le disposizioni regionali possano in futuro trovare una certa omogeneità.

Tab. 5 - NORMATIVE REGIONALI INERENTI LA TUBERCOLOSI E LA DIAGNOSTICA DELLE INFEZIONI DA MICOBATTERI.

Regione	Organizzazione dei laboratori				Normativa
	RRL	LUR	CRR	sede	
Abruzzo	No	No	No		
Basilicata	No	Si	Si	Laboratorio di Patologia Clinica, Azienda Sanitaria, Matera	Delibera Giunta Regionale n. 1241 del 20 aprile 1998
Calabria	No	No	Si	Laboratorio Microbiologia, Presidio Ospedaliero di Lamezia Terme, Catanzaro	Delibera Giunta Regionale n. 36 del 19 gennaio 2007. Circolare 9508/SIAR del 27 aprile 2011
Campania	Si	No	Si	Laboratorio Microbiologia e Virologia, AORN Monaldi, Napoli	Delibera Giunta Regionale n. 1577 del 15 ottobre 2009
Emilia Romagna	No	No	No		
Friuli Venezia Giulia	No	No	No		
Lazio	No	No	No		
Liguria	No	No	No		

SEGUE →

Regione	Organizzazione dei Laboratori				Normativa
	RRL	LUR	CRR	sede	
Lombardia	Si	No	Si	Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AO Niguarda, Milano	Delibera Giunta Regionale n. 7/19767 del 10 dicembre 2004. Prevenzione, sorveglianza e controllo della tubercolosi. Delibera Giunta Regionale n. 8/11154 del 3 febbraio 2010. Revisione e aggiornamento degli interventi di sorveglianza, prevenzione, profilassi e controllo delle malattie infettive
Marche	No	Si	Si	Laboratorio di Patologia Clinica, AO Ospedali Riuniti, Ancona	Delibera Giunta Regionale n. 256 del 26 marzo 2007. Linee guida per la prevenzione, la sorveglianza e il controllo della malattia tubercolare nelle Marche
Molise	No	No	No		
Piemonte	No	No	Si	Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino	Delibera Giunta Regionale n. 16/1829 del 7 aprile 2011. Attuazione Piano di rientro. Disposizioni alle Aziende Sanitarie Regionali in merito alla riorganizzazione della rete dei Laboratori Analisi, Anatomie Patologiche e Servizi di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale (SIMT) e indirizzi su appropriatezza prescrittiva
Puglia	Si	No	Si	Laboratorio Microbiologia e Virologia, AOU Policlinico, Bari	Delibera Giunta Regionale n. 614 del 16 maggio 2000. Programma regionale per il controllo e la prevenzione della tubercolosi
Sardegna	No	No	No		
Sicilia	No	No	No		
Toscana	Si	No	Si	Laboratorio Microbiologia e Virologia, AOU Careggi, Firenze	Delibera Giunta Regionale n. 756 dell'11 luglio 2000. Approvazione linee guida per il controllo della tubercolosi e protocollo regionale
Trentino Alto Adige	No	No	No		
Umbria	No	Si	Si	Istituto di Microbiologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Perugia	Piano Sanitario Regionale 2003-2005
Valle d'Aosta	No	No	No		
Veneto	Si	No	Si	Istituto di Microbiologia e Biotechnologie Mediche, Policlinico, Padova	Delibera Giunta Regionale n. 3643 del 19 novembre 2004

RRL, Rete Regionale dei Laboratori; LUR, Laboratorio Unico Regionale; CRR, Centro Regionale di Riferimento.

15.4.2. IL DISPENSARIO FUNZIONALE AZIENDALE

Il Dispensario Funzionale Aziendale è previsto dalle linee guida per il controllo della malattia tubercolare (2), ma per il momento ha trovato applicazione in pochissime realtà. Di esso devono obbligatoriamente far parte il clinico (pneumologo e infettivologo) e il medico di Igiene e sanità pubblica, ma è auspicabile che a questi si aggiungano le altre figure professionali che contribuiscono alla gestione e al controllo della tubercolosi e in particolare il microbiologo.

15.5. LA PROPOSTA DI RIORDINO DEL GRUPPO DI LAVORO MICOBATTERI AMCLI

Il modello proposto dal Supplemento n. 35 alla GU n. 40 del 1999 (2), pur essendo valido da un punto di vista teorico, non è stato recepito ovunque, probabilmente perché non tiene conto di realtà territoriali e di contesti organizzativi delle strutture sanitarie anche significativamente diversi a seconda dell'area geografica considerata. Il Gruppo di Lavoro Micobatteri AMCLI ha elaborato un progetto volto alla definizione dei parametri strutturali e funzionali indispensabili per eseguire un riordino della diagnostica dei micobatteri secondo tempi e modalità clinicamente utili (tab. 6). Tale progetto si basa sui seguenti capisaldi:

- requisiti strutturali e dotazione strumentale. Adeguamento delle strutture di laboratorio a quanto previsto dall'allegato XLVII del Decreto Legislativo n. 81 del 9 aprile 2008;
- attività e performance del laboratorio. Adeguamento della diagnostica a standard di eccellenza per quanto attiene a:
 - tipo di metodiche diagnostiche adottate;
 - tempi di refertazione;
 - controllo di qualità su ogni aspetto della diagnostica erogata;
- gestione delle risorse umane:
 - disponibilità di personale, esclusivamente dedicato, ad alto grado di professionalità;
 - ottimizzazione e flessibilità nell'impiego del personale;
- controllo della malattia tubercolare:
 - collegamento in rete dei laboratori per favorire il flusso informativo ai fini di una diagnosi rapida e di un efficace contenimento della diffusione della malattia;
 - disponibilità, presso un unico centro, dei dati microbiologici utili al controllo della malattia tubercolare (segnalazione dei casi, monitoraggio delle resistenze).

Alla luce di quanto detto, le Regioni si trovano nella condizione di dover riordinare la diagnostica microbiologica dei micobatteri adottando modelli differenti in base all'entità della popolazione residente (fig. 15.1):

- fino a due milioni di abitanti: Laboratorio Unico Regionale. Questo laboratorio riunisce i livelli 2 e 3. Tutti i restanti laboratori svolgono funzioni di livello 1;
- sopra i due milioni di abitanti: laboratori di area vasta (solitamente provinciali) che svolgono funzioni di livello 2 con individuazione di un Centro Regionale di Riferimento che svolge i compiti di livello 3. Tutti i restanti laboratori svolgono i compiti di livello 1.

Si rendono inoltre necessari progetti personalizzati per le aree metropolitane più complesse (Roma, Milano, Napoli).

Dovrebbero essere individuati inoltre tre Centri Macroregionali (Nord, Centro e Sud) ove concentrare l'attività di più alto livello tecnico-scientifico (epidemiologia molecolare, sequenziamento).

Tab. 6 - COMPITI E REQUISITI DEI LABORATORI DI MICOBATTERIOLOGIA SUDDIVISI PER LIVELLI DI ATTIVITÀ DIAGNOSTICA.

<p>Laboratorio di 1° livello</p>	<p>COMPITI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - valutazione dell'adeguatezza del campione - esame microscopico e comunicazione del risultato entro 24 ore - invio del campione entro 24 ore a laboratorio di livello superiore <p>REQUISITI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - esecuzione di almeno 10-15 esami microscopici/settimana - utilizzo di cabina di biosicurezza classe II - livello di biosicurezza 2 - controllo di qualità interno - partecipazione al programma di sorveglianza regionale della tubercolosi
<p>Laboratorio di 2° livello Bacino di utenza: 1 milione di abitanti</p>	<p>COMPITI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - valutazione dell'adeguatezza del campione - esame microscopico e comunicazione del risultato entro 24 ore - test di identificazione di <i>M. tuberculosis</i> complex mediante amplificazione genica da campioni clinici - esame colturale in terreno liquido e su terreno solido - identificazione degli isolati del <i>M. tuberculosis</i> complex - test di sensibilità sui ceppi del <i>M. tuberculosis</i> complex ai farmaci di prima linea - invio degli isolati non tubercolari ai laboratori di livello superiore - partecipazione al programma di sorveglianza regionale della tubercolosi <p>REQUISITI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - esecuzione di esame microscopico e colturale su almeno 20 campioni/settimana - livello di biosicurezza 3: a) zona di lavoro separata e ad accesso limitato; b) utilizzo cabine di biosicurezza di classe II; c) utilizzo di centrifughe refrigerate con protezione antiaerosol - controllo di qualità interno ed esterno - programma di formazione e aggiornamento permanente degli operatori - partecipazione al programma di sorveglianza regionale della tubercolosi
<p>Laboratorio di 3° livello Bacino di utenza: 5-10 milioni di abitanti</p>	<p>COMPITI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - attività dei livelli precedenti - esecuzione di almeno 20 test di sensibilità/anno per <i>M. tuberculosis</i> complex ed eventuale antibiogramma per farmaci di seconda scelta - identificazione a livello di specie nell'ambito di <i>M. tuberculosis</i> complex - identificazione degli isolati non tubercolari ed eventuale test di sensibilità ai farmaci - genotipizzazione dei ceppi tubercolari - valutazione e acquisizione delle nuove tecnologie - sorveglianza epidemiologica di tubercolosi, micobatteriosi e farmaco-resistenza - coordinamento e gestione di programmi di formazione e aggiornamento del personale <p>REQUISITI:</p> <ul style="list-style-type: none"> - requisiti previsti al 2° livello: livello di biosicurezza 3 - conservazione della documentazione dei controlli di qualità interno ed esterno per tre anni - conservazione dei ceppi - personale con adeguato curriculum professionale nel settore della micobatteriologia - partecipazione al programma di sorveglianza regionale della tubercolosi

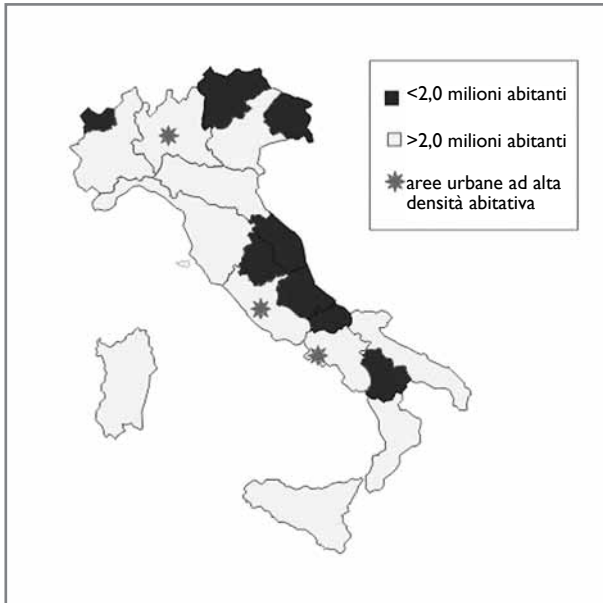


Fig. 15.1 - DENSITÀ ABITATIVA DELLE VARIE AREE GEOGRAFICHE.

15.6. CONCLUSIONI

I dati attualmente disponibili sulla situazione in Italia indicano che l'adeguamento dei laboratori di micobatteriologia ad elevati standard diagnostici, organizzativi e di sicurezza e la loro riorganizzazione in livelli di diversa attività, che tengano conto delle specifiche realtà territoriali, rappresentano scelte improcrastinabili nell'ambito di una politica sanitaria oculata.

BIBLIOGRAFIA

1. Decreto legislativo n. 81 del 9 aprile 2008.
2. Documento di linee guida per il controllo della malattia tubercolare, su proposta del Ministero della Sanità. Supplemento ordinario n. 35 della Gazzetta Ufficiale n. 40 del 18 febbraio 1999.
3. ATS, *Levels of laboratory services for mycobacterial diseases: official statement of the American Thoracic Society*, 1983, *Am Rev Respir Dis*; 128:213.
4. ATS, CDC, IDSA, *Controlling tuberculosis in the United States*, 2005, *Am J Respir Crit Care Med*; 172:1169-1227.
5. Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, *Mycobacterium tuberculosis: assessing your laboratory*, 1995, Atlanta, Ga.
6. CDC, *Controlling tuberculosis in the United States: recommendations from the American Thoracic Society, CDC, and the Infectious Diseases Society of America*, 2005, *MMWR*; 54:1-81.
7. CDC, *National plan for reliable tuberculosis laboratory services using a system approach*, 2005, *MMWR*; 54:1-12.
8. Cernoch P.L., Enns R.K., Saubolle M.A., Wallace R.J. Jr. Cumitech 16A, *Laboratory diagnosis of the mycobacterioses*, 1994, Weissfeld AS, Washington DC.
9. Mandler F., Passerini Tosi C., Scarparo C., Tortoli E., Piersimoni C., *Proposta di linee-guida per la diagnostica microbiologica della tubercolosi*, 1999, *Microbiologia Medica*; 14:313-330.
10. Ministero della Salute, *Manuale tecnico per la diagnosi microbiologica della tubercolosi*, Lettera Circolare del 26 febbraio 2004.
11. Piersimoni C., Mandler F., Marchetti D., Molinari G.L., Riva R., Tortoli E., Tronci M., Scarparo C., *Mycobacterial testing in hospital laboratories: results from a questionnaire survey in Italy*, 2004, *Clin Microbiol Infect*; 10:1014-1017.
12. Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburgh C.R., Good R.C., *The resurgence of tuberculosis. Is your laboratory ready?*, 1993, *J Clin Microbiol*; 31:767-770.

Capitolo 16

LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI BOVINA NEI LABORATORI VETERINARI

**Maria Lodovica Pacciarini,
Mariagrazia Zanoni,
Daniela Gelmetti,
Maria Beatrice Boniotti,
Silvia Tagliabue,
Giovanni Alborali,
Claudio Piersimoni**

16. LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI BOVINA NEI LABORATORI VETERINARI

16.1. INTRODUZIONE

Mycobacterium bovis è responsabile della tubercolosi, malattia infettiva e contagiosa dei bovidi (bovini e bufalini) e di altri mammiferi (carnivori ed erbivori, sia selvatici che domestici), caratterizzata da lesioni nodulari di tipo granulomatoso (tubercoli) e trasmissibile all'uomo. È una patologia prevalentemente respiratoria ad evoluzione cronica progressiva.

La trasmissione di *Mycobacterium bovis* all'uomo è nota da più di un secolo ed è storicamente associata al consumo di latte crudo di bovini infetti. Nei Paesi industrializzati, l'applicazione di piani di eradicazione della tubercolosi bovina negli allevamenti bovini/bufalini e la pratica di pasteurizzazione del latte hanno ridotto significativamente l'infezione di tubercolosi bovina nell'uomo. I dati forniti dalla European Food Safety Agency per il 2009 (4) indicano un numero di casi di tubercolosi umana attribuibili a *Mycobacterium bovis* inferiore allo 0,1% nella maggior parte dei Paesi della Comunità Europea, mentre il problema rimane rilevante nei Paesi in via di sviluppo.

16.1.1. VIE DI INFEZIONE/TRASMISSIONE

Nel bovino l'infezione da *Mycobacterium bovis* viene contratta per via respiratoria o in seguito a contaminazione ambientale. La via di trasmissione più comune appare quella respiratoria attraverso la diffusione di *aerosol* (goccioline di muco del diametro inferiore a 5 μm) contenente anche rari micobatteri (12). L'infezione da animale ad animale può aversi anche per via alimentare, a seguito dell'ingestione diretta di *Mycobacterium bovis* con il latte, o attraverso l'acqua. L'infezione può avvenire anche attraverso il contatto diretto con secrezioni animali e reflui contaminati presenti nei pascoli (10). L'infezione materno-fetale e quella genitale sono considerate molto rare (11).

La fonte principale di infezione per l'uomo è rappresentata dall'ingestione di latte non pasteurizzato o suoi derivati quali yogurt, formaggi freschi, burro. In teoria, anche il consumo di carne cruda o poco cotta proveniente da bovini infetti potrebbe rappresentare una fonte di infezione, tuttavia evidenze scientifiche mostrano che tale via di trasmissione ha un ruolo inesistente o trascurabile (3).

Nell'uomo il rischio di trasmissione per via respiratoria o attraverso cute e mucose è principalmente legato alle attività professionali svolte dagli operatori che hanno uno stretto e frequente contatto con animali *reservoir* di *Mycobacterium bovis* o con le loro carcasse: allevatori, veterinari, ispettori al macello e macellatori.

16.1.2. LA MALATTIA NEL BOVINO

La tubercolosi bovina è una malattia a decorso cronico, i cui quadri clinici sono variabili in rapporto a diversi parametri, quali porta di ingresso, andamento e localizzazione dell'infezione, entità della lesione, organi e tessuti colpiti e specie animale coinvolta.

È ormai raro riscontrare nei bovini la malattia conclamata, poiché la diagnosi con intradermoreazione tubercolinica porta alla precoce eliminazione degli animali reattivi, pratica che non consente di evidenziare le manifestazioni legate all'evoluzione della malattia. Inoltre, quando l'entità delle le-

sioni è modesta, può mancare una sintomatologia conclamata e indicativa. Nel caso in cui la malattia tenda a progredire, possono evidenziarsi sintomi di ordine generale come debolezza, dimagrimento, anoressia e rialzo termico.

Si possono osservare diversi stadi di infezione:

- infezione primaria in sede polmonare (via respiratoria), faringea o intestinale (via enterogena), epatica e dei linfonodi periportalari (via congenita). La lesione caratteristica è il complesso primario, completo o incompleto, che può evolvere a guarigione oppure incapsularsi e calcificare (infezione primaria latente);
- generalizzazione precoce acuta, caratterizzata da batteriemia tubercolare senza attecchimento dei micobatteri nei tessuti;
- generalizzazione precoce protratta caratterizzata da lesioni a carico di sierose e parenchimi. Esse possono condurre a morte l'animale, oppure possono incapsularsi e condurre nuovamente a batteriemia (infezione latente);
- reinfezione, di origine esogena, segue lo stesso decorso dell'infezione primaria;
- periodo post-primario, in cui manca la lesione linfonodale ed è assente la calcificazione; si instaura la tubercolosi cronica di organi isolati (tubercolosi cronica-evolutiva). Da un'infezione endogena o esogena, la lesione diffonde attraverso le vie linfoematologiche. Nei bovini non si ha guarigione e la lesione organica progredisce per lo più lentamente, ma può anche riacutizzarsi e condurre al collasso delle resistenze;
- generalizzazione acuta tardiva (collasso delle resistenze); avviene in un qualsiasi momento dell'infezione ed è caratterizzata da generalizzazione per via ematogena con rapida riacutizzazione delle lesioni locali degli organi.

Le forme acute sono causate dall'ingresso di micobatteri nel circolo sanguigno, ad ondate continue o successive, e portano alla formazione di tubercoli disseminati in tutti gli organi.

La sintomatologia clinica è strettamente legata alla sede della lesione e al decorso della malattia.

Le forme croniche, riacutizzate, si caratterizzano per la compromissione dello stato generale con lento e progressivo dimagrimento, temperatura subfebbrile o febbre intermittente e sintomi legati alla sede della lesione.

Negli stadi iniziali (generalizzazione precoce), le lesioni sono evidenti soprattutto a carico dei linfonodi bronchiali, sottomascellari e retrofaringei. Le lesioni polmonari sono quelle di una polmonite a focolai lobulari e si caratterizzano in fenomeni reattivi di varia forma ed estensione, a contorni per lo più irregolari, di aspetto lardaceo. Dopo un inizio acuto, il processo tende a cronicizzare con trasformazione dei focolai in noduli caseo-calcarei.

Nei casi cronici, le lesioni si traducono invece in quadri di broncopolmonite caseosa acinosa o lobulare, di polmonite caseosa diffusa, nonché di polmonite cronica con colliquazione delle aree lese e conseguente cavitazione. Nel bovino si riscontrano spesso anche lesioni in sede pleurica e, meno frequentemente, peritoneale, entrambe derivanti da una disseminazione micobatterica attraverso il circolo linfatico locale.

16.1.3. LA TUBERCOLOSI BOVINA IN ITALIA

In Italia è in atto dal 1977 un programma obbligatorio di eradicazione della malattia, che ha portato a una drastica diminuzione della percentuale di allevamenti infetti: dal 5% globale nel 1989

fino al recente dato epidemiologico del 2011, che riporta una percentuale di allevamenti infetti dello 0,4%.

Il programma di eradicazione si basa sul Regolamento di Polizia Veterinaria e sulla legislazione europea e italiana (DM 592/95 e DL 196/99) che definiscono un programma obbligatorio che si applica agli allevamenti di bovini/bufali presenti sul territorio nazionale; esso prevede:

- esecuzione della prova diagnostica tubercolinica a intervalli di 1-2 anni su tutti i bovini provenienti da allevamenti da riproduzione;
- ispezione delle carcasse e dei visceri al macello, per il rilevamento di lesioni sospette o compatibili con tubercolosi bovina;
- esecuzione di analisi di laboratorio sui campioni prelevati al macello da animali sospetti.

In caso di conferma della malattia si attivano una serie di provvedimenti riassunti nei punti seguenti:

- isolamento e abbattimento degli animali infetti;
- blocco dell'allevamento fino al riscontro della negatività di almeno due prove tubercoliniche, eseguite a un intervallo di sei mesi una dall'altra, per tutti i bovini di età superiore alle sei settimane;
- indagini epidemiologiche volte a stabilire eventuali correlazioni tra l'allevamento infetto e altri allevamenti.

La percentuale media di allevamenti infetti in Italia varia a seconda delle Regioni. La situazione epidemiologica è, nella maggior parte delle Regioni del Nord, quella di "territorio ufficialmente indenne da tubercolosi" (*Officially Tuberculosis Free*, OTF), corrispondente a una prevalenza di allevamenti infetti <0,1% confermata per almeno 6 anni consecutivi. Fanno eccezione Liguria e Valle d'Aosta, che nel 2010 avevano rispettivamente percentuali di 0,2 e 1,3%; il Piemonte, avendo una percentuale <0,1% dal 2010, non ha ancora raggiunto lo status di OTF. Nel Sud Italia permangono alcune Regioni con livelli di positività preoccupanti, quali la Sicilia, con un 3,8% di allevamenti infetti, e in misura inferiore Calabria, Puglia, Campania e Basilicata con percentuali comprese fra 0,4 e 0,6%.

16.1.4. INFEZIONI DA *MYCOBACTERIUM BOVIS* NELL'UOMO

Nei Paesi industrializzati la morbilità da *Mycobacterium bovis* nell'uomo è inferiore all'1%. I pazienti sono per lo più soggetti professionalmente esposti (allevatori, veterinari) che vivono in Paesi endemici per la tubercolosi bovina (9). La trasmissione interumana di *Mycobacterium bovis*, pur se infrequente, è possibile anche in assenza di condizioni predisponenti (5). Sebbene clinicamente indistinguibile dalla malattia tubercolare causata da *Mycobacterium tuberculosis*, la tubercolosi da *Mycobacterium bovis* è caratterizzata da un maggior numero di localizzazioni extrapolmonari (legate anche alla via d'ingresso dei micobatteri) o disseminate, e sembra anche esitare in una prognosi meno favorevole (13). Più comunemente, l'ingestione di latte infetto (non pastorizzato) può causare una linfadenite cervicale oppure un'adenite mesenterica con interessamento ileo-cecale e successiva peritonite (6).

Nei bambini di età inferiore a 5 anni, entro 3-9 mesi dall'infezione, può insorgere una tubercolosi disseminata che esordisce con quadri polmonari di tipo miliare e di meningite. Negli adulti la malattia si manifesta prevalentemente a carico del tratto gastrointestinale, dell'apparato osteo-articolare e del sistema nervoso centrale.

16.2. GLI ESAMI DI LABORATORIO PER LA CONFERMA DI TUBERCOLOSI BOVINA

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali presenti sul territorio (Rete Zooprofilattica Italiana) sono coinvolti principalmente nell'esecuzione e nell'interpretazione degli esami di laboratorio per la conferma diagnostica di tubercolosi bovina, resa necessaria dal risultato, dubbio o positivo, del test tubercolinico o dal reperto di lesioni sospette al macello.

I metodi di riferimento sono descritti nell'allegato tecnico della normativa nazionale (DM 592/95) e nel capitolo 2.4.7. del *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE 2011).

In attesa del rinnovo della legislazione che regola il programma di eradicazione della tubercolosi bovina in Italia, il Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi da *Mycobacterium bovis* (TBCentro) ha aggiornato la diagnostica di laboratorio introducendo la coltura su terreni liquidi e vari metodi molecolari per l'identificazione e la genotipizzazione dei ceppi isolati.

In questo capitolo vengono illustrati il percorso diagnostico che i veterinari ispettori seguono per identificare gli animali affetti da tubercolosi e gli esami eseguiti presso il TBCentro e presso gli istituti zooprofilattici per isolare e identificare i ceppi micobatterici. Vengono descritti in particolare l'esame macroscopico, il prelievo degli organi, le modalità di trasporto dei campioni e le procedure specifiche applicate in medicina veterinaria per l'esecuzione e l'interpretazione degli esami di laboratorio finalizzati alla diagnosi di tubercolosi bovina.

16.2.1. ESAME ANATOMO-PATOLOGICO

Gli approfondimenti diagnostici per rilevare animali con tubercolosi bovina iniziano al macello con la visita ispettiva *post mortem* da parte dell'ispettore veterinario. Deputati al riconoscimento delle lesioni tubercolari sono anche i veterinari che operano nelle sezioni diagnostiche dei dieci Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) presenti sul territorio nazionale.

Gli animali sospetti, che comprendono:

- bovini con reazione positiva o dubbia alla prova tubercolinica;
- bovini provenienti da un focolaio di tubercolosi bovina;
- bovini regolarmente macellati in cui sono state riscontrate lesioni sospette;
- animali specificamente segnalati;

sono sottoposti a necropsia. Essa comprende l'esame ispettivo e il prelievo dei campioni.

L'esame ispettivo riguarda tutti gli organi più frequentemente esposti all'infezione tubercolare:

- polmoni (organi bersaglio nell'infezione per via aerogena);
- intestino e fegato (organi bersaglio nell'infezione per via digerente);
- tutti i relativi linfonodi regionali.

Il rilevamento di eventuali lesioni prevede la palpazione degli organi e dei linfonodi tributari e l'esecuzione di tagli paralleli, a distanza di pochi centimetri l'uno dall'altro, per evidenziare lesioni profonde o tubercoli miliari. Una volta localizzata la lesione si procede al prelievo.

In assenza di lesioni macroscopiche visibili (*Non Visible Lesions*, NVL), si prelevano, negli animali tubercolino-positivi o sospetti, alcuni linfonodi da ciascuno dei pacchetti rappresentativi degli apparati digerente, respiratorio e mammario:

- linfonodi mandibolari;
- linfonodi retrofaringei;

- linfonodi mediastinici;
- linfonodi peribronchiali;
- linfonodi periepatici;
- linfonodi mesenterici;
- linfonodi sopramammari.

Per un riscontro diagnostico più informativo possono essere prelevati anche amigdale e fegato.

16.2.2. RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI

I campioni devono essere prelevati asetticamente, riposti in contenitori sterili e consegnati alla sede più vicina dell'IZS di competenza. L'utilizzo o meno di conservanti/fissativi è condizionato dai tempi di consegna. Si raccomanda di consegnare i campioni da esaminare al laboratorio prima possibile. Quando è possibile la consegna entro 48 ore i campioni vengono conservati refrigerati (4 °C) senza conservanti o fissativi.

Quando è prevedibile una consegna oltre le 48 ore il campione deve essere diviso in due parti, facendo in modo che le lesioni macroscopiche siano presenti in entrambe: una viene fissata in formalina tamponata al 10% per gli esami istologici e l'altra viene congelata per la coltura e le indagini di biologia molecolare. In caso di lesioni molto piccole, non divisibili, tutto il prelievo viene destinato all'esame colturale.

16.2.3. SCHEMA DIAGNOSTICO SEGUITO PRESSO IL TBCENTRO

In figura 16.1 è schematizzato il protocollo diagnostico utilizzato presso il TBCentro.

Il campione viene preparato per l'esame colturale e per l'esame istologico. Il campione, sottoposto a decontaminazione e omogenizzazione, viene suddiviso in due aliquote: una per l'isolamento colturale e una per la reazione PCR diretta su tessuto.

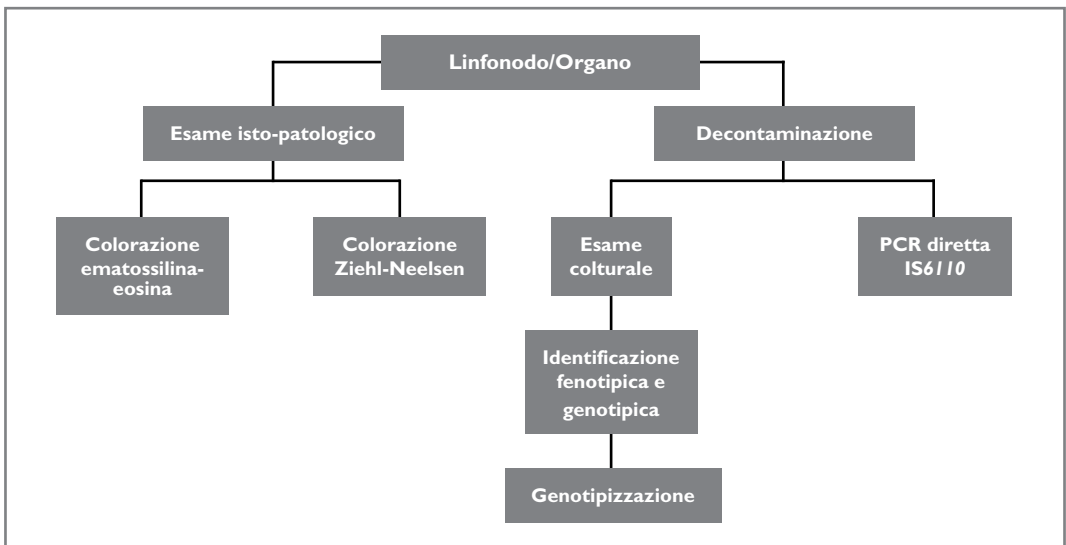


Fig. 16.1 - PERCORSO DIAGNOSTICO.

16.2.4. ESAME ISTOLOGICO

Le finalità dell'esame istologico sono:

- il raggiungimento della diagnosi di infezione da micobatteri;
- il rilevamento di lesioni tubercolari nei campioni con NVL;
- la diagnosi differenziale del granuloma da micobatteri rispetto ad altre lesioni granulomatose;
- il rilevamento di eventuali co-infezioni (micobatteri e altri microrganismi);
- la definizione e la classificazione delle lesioni macroscopiche.

16.2.4.1. CAMPIONAMENTO

Il campionamento è una delle fasi più importanti del processo diagnostico. Gli organi ricevuti vengono identificati, descritti e sezionati interamente con tagli trasversali distanti tra loro pochi millimetri, per mettere in evidenza la presenza di tubercoli. Vengono registrati il numero, la forma, il colore e le dimensioni delle lesioni rilevate. Una o più sezioni di circa 0,3 cm di spessore, prelevate mantenendo i rapporti anatomici tra la porzione patologica (lesione) e non patologica dell'organo, vengono disidratate e incluse in paraffina.

16.2.4.2. COLORAZIONE

I campioni inclusi in paraffina vengono sezionati (spessore 3 μm) e colorati con ematossilina-eosina. In caso di rilevamento di granulomi si esegue, su tre sezioni seriate dello spessore di 3 μm , anche la colorazione di Ziehl Neelsen (o di Kinyoun). Tali colorazioni permettono di evidenziare in maniera ottimale i micobatteri, che appaiono come bastoncini lunghi e sottili (2-8 \times 0,5 μm), talvolta ricurvi, isolati o raccolti in piccoli gruppi, nel citoplasma dei macrofagi, nelle cellule di Langhans o nelle aree di necrosi. Alcuni possono presentare un aspetto bandeggiato con zone scarsamente colorate o del tutto prive di colore. L'esame microscopico per bacilli alcol-acido-resistenti, pur essendo molto specifico, ha una bassa sensibilità. È questo il motivo dell'osservazione di tre sezioni seriate, non è infatti raro che i campioni positivi risultino tali in una, o due soltanto, delle sezioni esaminate. La presenza di bacilli alcol-acido-resistenti nei preparati istologici rafforza la diagnosi di infezione da micobatteri.

16.2.4.3. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La diagnosi microscopica di infezione micobatterica in campioni di tessuto scaturisce dalla combinazione del dato istologico e dell'esito della colorazione per bacilli alcol-acido-resistenti. In base alle diverse combinazioni si distinguono cinque livelli di positività che definiscono altrettante diagnosi (tab. 1). È doveroso sottolineare che per l'apertura di un focolaio di tubercolosi bovina e l'avvio delle conseguenti misure di profilassi e contenimento la diagnosi microscopica non è determinante, essendo richiesto tassativamente l'isolamento di *Mycobacterium bovis*.

16.2.5. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'ESAME CULTURALE

I campioni per l'esame culturale possono presentare o meno lesioni evidenti.

Nel primo caso, se i campioni presentano piccole lesioni e/o lesioni primarie, queste possono essere utilizzate integralmente per la preparazione dell'omogenato; se invece si hanno lesioni granulomatose caseose è opportuno utilizzare le zone marginali di connettivizzazione. È comunque difficile stabilire quantità minime di materiale per la preparazione dell'omogenato.

Nel caso di campioni senza lesioni evidenti è necessario allestire l'omogenato da *pool* di frammenti di tessuto di almeno 25 g.

Tab. 1 - SUDDIVISIONI IN CLASSI DELL'ESPRESSIONE DEI RISULTATI ISTOLOGICI^a

Classe	Ematossilina-eosina	Colorazione per BAAR	Diagnosi
0	Lesioni assenti	NE	Assenza di lesioni granulomatose
1	Granuloma specifico	Positiva	Infezione da micobatteri
2	Granuloma specifico	Negativa	Compatibilità con infezione da micobatteri
3	Granuloma non tubercolare	Negativa	Lesione granulomatosa non sostenuta da micobatteri
4	<i>Club forming</i> granuloma	Negativa	Actinogranuloma

^a BAAR, Bacilli Alcol-Acido-Resistenti; NE, Non Eseguita.

L'omogenato può essere ottenuto dal campione, preliminarmente sminuzzato con le forbici e risospeso in 2-3 mL di tampone fosfato pH 6.5, utilizzando pestello e mortaio o un omogeneizzatore a lama o peristaltico.

16.2.5.1. DECONTAMINAZIONE DELL'OMOGENATO

Dato che il materiale clinico può essere contaminato da altre specie microbiche, prima di procedere alla semina è necessario decontaminarlo, seguendo uno o più dei protocolli sotto descritti.

Idrossido di sodio:

- trattare l'omogenato con ugual volume di NaOH al 2-4%;
- mantenere in termostato a 37 °C per 30 minuti;
- neutralizzare con acido solforico al 10% goccia a goccia (circa 1,8 mL), utilizzando rosso fenolo come indicatore di pH;
- centrifugare per 15 minuti a 3000 g (o per 20 minuti a 2000 g) in centrifuga refrigerata;
- eliminare il surnatante;
- risospendere il sedimento con 2 mL di tampone fosfato pH 6.8 e inoculare i terreni di coltura con un volume di 0,2-1 mL, in relazione al terreno utilizzato.

Sodio dodecilsolfato (SDS, laurilsolfato di sodio):

- trattare l'omogenato con ugual volume di decontaminante (SDS 3,16% + NaOH 1%);
- mantenere a temperatura ambiente in agitazione per 40 minuti;
- aggiungere bromocresol-porpora 0,006% e acido fosforico 1,43% fino a viraggio dell'indicatore al giallo arancio;
- centrifugare per 15 minuti a 3000 g (o per 20 minuti a 2000 g) a 8-10 °C;
- eliminare il surnatante;
- risospendere il sedimento in 10 mL di soluzione fisiologica sterile;
- centrifugare per 15 minuti a 3000 g (o per 20 minuti a 2000 g) a 8-10 °C;
- risospendere il sedimento con 2 mL di tampone fosfato pH 6.8 e inoculare i terreni di coltura con un volume di 0,2-1 mL in relazione al terreno utilizzato.

Esadecilpiridiniocloruro (HPC, cetilpiridiniocloruro):

- trattare l'omogenato con ugual volume di HPC 1,5%;
- mantenere a temperatura ambiente in agitazione per 30 minuti;
- centrifugare per 15 minuti a 3000 g (o per 20 minuti a 2000 g) a 8-10 °C;

- risospendere il sedimento con 2 mL di tampone fosfato pH 6,8 e inoculare i terreni di coltura con un volume di 0,2-1 mL in relazione al terreno utilizzato.

16.2.6. COLTURA

Per la coltura dei micobatteri possono essere utilizzati terreni solidi, terreni liquidi o entrambi.

16.2.6.1. COLTURA IN TERRENI SOLIDI

Vengono solitamente utilizzate combinazioni di terreni a base di uovo a diversa selettività, quali Löwenstein-Jensen, Stonebrink e Coletsos, addizionati o meno con piruvato o glicerolo.

È bene effettuare la semina su almeno due diversi terreni a becco di clarino, ad esempio:

- una provetta di Löwenstein-Jensen;
- una provetta di Stonebrink.

Incubare i terreni per 8 settimane a 37 °C in presenza o in assenza di CO₂.

Esaminare i terreni dopo 2-5 giorni di incubazione e in seguito almeno settimanalmente.

16.2.6.2. ISOLAMENTO IN TERRENI LIQUIDI

La semina può essere effettuata in terreni colturali liquidi a base di Middlebrook 7H9 addizionato con una miscela di antibiotici e supplementi di crescita.

Incubare i terreni inoculati per 6 settimane a 37 °C ed esaminarli almeno due volte la settimana.

La crescita può essere valutata sulla base della torbidità oppure utilizzando un rilevatore di crescita, manuale o automatizzato, specifico per il terreno utilizzato (es. rivelatore di fluorescenza).

16.2.7. IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI

L'identificazione, a partire dei micobatteri isolati, può essere effettuata:

- determinando le caratteristiche colturali, biochimiche, morfologiche e tintoriali;
- mediante indagini molecolari.

16.2.7.1. IDENTIFICAZIONE TRADIZIONALE

L'identificazione fenotipica tradizionale si basa sui test seguenti:

- esame microscopico per il rilevamento di morfologia, alcol-acido-resistenza, presenza del "fattore cordale";
- temperatura di crescita a 37 °C e a 42 °C;
- velocità di crescita: rapida (dopo incubazione non superiore a 7 giorni), lenta (dopo incubazione per un tempo superiore a 7 giorni);
- morfologia (macro-microscopica) delle colonie cresciute su terreno Middlebrook 7H10 distribuito in piastre;
- test biochimici per la differenziazione dei micobatteri di interesse medico (*Mycobacterium bovis*/*Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis*): ureasi, riduzione del tellurito, riduzione dei nitrati, e, facoltativamente, quale ulteriore conferma, la prova di crescita in presenza di TCH (idrazide dell'acido 2-tiofen-carbossilico) e il test della niacina.

I test biochimici devono essere eseguiti da colture abbondanti, in fase di attiva crescita, su terreno solido e devono sempre essere accompagnati da controlli positivo e negativo.

- Ureasi:

- inoculare 1 o 2 ansate di coltura in un volume variabile da 0,5 a 4 mL di brodo contenente urea (2%), glucosio (0,1%) e rosso fenolo (0,0012%) e incubare a 37 °C per 3 giorni;
- la reazione è positiva in caso di viraggio del colore del terreno da rosso-arancio a rosso-porpora.
- Riduzione del tellurito:
 - inoculare 1 o 2 ansate di coltura in 5 mL di brodo Middlebrook 7H9 e incubare a 37 °C per 7 o più giorni, fino a crescita visibile;
 - aggiungere 0,1 mL di una soluzione acquosa di potassio tellurito allo 0,2% e reincubare per 4 giorni;
 - la reazione è positiva se compare un precipitato nero.
- Riduzione dei nitrati:
 - inoculare 1 o 2 ansate di coltura in 1 mL di substrato (nitrato di sodio 0,01 M in tampone fosfato 1/45 M, pH 7) e incubare per 2 ore a 37 °C;
 - aggiungere 0,1 mL di una soluzione acquosa di acido sulfanilico allo 0,8%, acido acetico al 30% e 0,1 mL di una soluzione acquosa di N,N-dimetil-1-naftilammina allo 0,6% e acido acetico al 30%;
 - la reazione è positiva se si ha sviluppo di colore rosso;
 - la reazione è negativa se il colore rosso compare solo dopo aggiunta di polvere di zinco.
- Crescita in presenza di TCH:
 - con una o due ansate di coltura preparare una sospensione batterica in 2 mL di brodo Middlebrook 7H9;
 - inoculare 0,2 mL della sospensione su terreno Middlebrook 7H10 contenente TCH (5 µg/mL) e sullo stesso terreno privo di TCH (controllo);
 - incubare a 37 °C e verificare la crescita su entrambi i terreni fino alla comparsa di colonie sul terreno di controllo;
 - mantenere in incubazione il terreno contenente TCH per un periodo massimo di 2 settimane dopo la crescita sul terreno di controllo.
- Niacina:
 - aggiungere 1 mL di acqua distillata sterile a una coltura in Löwenstein-Jensen e lasciare per 2 ore a temperatura ambiente per estrarre la niacina dal terreno;
 - trasferire 0,5 mL dell'estratto in una provetta, aggiungere un ugual volume di soluzione alcolica di anilina al 4% e quindi aggiungere 0,5 mL di bromuro di cianogeno al 10% (da non inalare o mettere a contatto con la cute ed eliminare solo dopo alcalinizzazione con NaOH);
 - un immediato sviluppo di colore giallo indica la positività della reazione.

In alternativa può essere utilizzato uno dei sistemi per il test niacina reperibili in commercio.

In tabella 2 è riportato lo schema identificativo per le specie di micobatteri di prevalente interesse medico basato sulle caratteristiche di crescita e sulle prove sopra descritte.

16.2.7.2. TECNICHE MOLECOLARI

Presso gli IZS viene utilizzato un protocollo basato sull'amplificazione specifica di tre regioni di DNA (8): due all'interno dell'rRNA 16S e una nel gene MPB70. La metodica si articola in tre fasi:

- preparazione del campione (DNA genomico da ceppo isolato);
- allestimento di tre reazioni di PCR (che possono essere eseguite singolarmente o in *multiplex*, utilizzando i *primer* riportati in tabella 3);
- analisi delle dimensioni dei prodotti di PCR mediante elettroforesi (tabella 4: combinazione *primer* e dimensione prodotti amplificati) e interpretazione secondo lo schema di identificazione riportato in tabella 5.

Tale protocollo permette il riconoscimento dei microrganismi appartenenti al genere *Mycobacterium* e la differenziazione dei micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex e alla specie *Mycobacterium avium*.

Sugli organismi risultati appartenere al *Mycobacterium tuberculosis* complex (che comprende *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, “*Mycobacterium canettii*”, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii*), è necessario effettuare successivi approfondimenti ai fini di una corretta differenziazione di *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium caprae* dagli altri componenti del complesso, utilizzando una delle metodiche seguenti:

- test biochimico-colturali descritti sopra;
- PCR/RFLP del gene *gyrB* (1, 2);
- *Spoligotyping*;
- sistema multiplo di PCR descritto da Huard et al. (7).

Si suggerisce di utilizzare il protocollo basato sui polimorfismi di restrizione esistenti all'interno del gene *gyrB* che sono rilevabili mediante amplificazione della porzione di 765 pb del gene *gyrB*, seguita dalla digestione con l'enzima di restrizione *RsaI*. La metodica prevede:

- estrazione del DNA;
- PCR utilizzando i *primer* riportati in tabella 6;
- digestione con l'enzima di restrizione *RsaI* del prodotto amplificato;
- analisi dei prodotti di digestione mediante elettroforesi e interpretazione secondo lo schema di identificazione riportato in tabella 7.

Tab. 2 - SCHEMA IDENTIFICATIVO IN BASE ALLE CARATTERISTICHE DI CRESCITA E ALLE PROVE BIOCHIMICHE^a.

Specie/ Raggruppamento	Crescita		Ureasi	Tellurito	Nitrati	TCH	Niacina
	37 °C	42 °C					
<i>M. bovis</i> / <i>M. caprae</i>	L	–	±	–	–	–	–
<i>M. avium</i> complex	L	L	–	+	–	+	–
<i>M. tuberculosis</i>	L	–	±	±	+	+	+

^aTCH, idrazide dell'acido 2-tiofen carbossilico; L, crescita lenta (>7 giorni); –, reazione negativa o assenza di crescita; +, reazione positiva o presenza di crescita; ±, reazione intermedia.

Qualora gli esiti delle prove microscopiche e colturali siano compatibili con il genere *Mycobacterium* (aspetto caratteristico dei bacilli e delle colture) e gli esiti delle prove biochimiche non siano, del tutto o in parte, conformi a quelli di nessuna delle specie riportate nella tabella, fare ricorso alle tecniche molecolari (vedi tab. 5).

Tab. 3 - PRIMER PER L'IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI^a.

Oligonucleotide	Sequenza 5'-3'
MycGen-Fw	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
MycGen-Rev	TGCACACAGGCCACAAGGGA
MycAv-Rev	ACCAGAAGACATGCGTCTTG
TB-Fw	GAACAATCCGGAGTTGACAA
TB-Rev	AGCACGCTGTCAATCATGTA

^a Il primer MycGen-Fw partecipa all'amplificazione di due diverse regioni del gene codificante per rRNA.

Tab. 4 - COMBINAZIONE DI PRIMER E DIMENSIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE.

Identificazione	Primer	Dimensione del prodotto
genere <i>Mycobacterium</i>	MycGen-Fw MycGen-Rev	1030 pb
<i>M. tuberculosis</i> complex	TB-Fw TB-Rev	372 pb
<i>M. avium</i>	MycGen-Fw MycAv-Rev	180 pb

Tab. 5 - SCHEMA DI IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI – TECNICHE MOLECOLARI.

Amplificazione genica con primer specifici per:			Identificazione
genere <i>Mycobacterium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	
+	+	-	<i>M. avium</i>
+	-	+	<i>M. tuberculosis</i> complex ^a
+	-	-	Micobatterio non tubercolare

^a È necessaria la conferma colturale; l'identificazione di specie viene raggiunta ricorrendo allo *Spoligotyping* o a PCR/RFLP del gene *gyrB*.

Tab. 6 - PRIMER PER L'IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI APPARTENENTI AL *M. TUBERCULOSIS* COMPLEX.

Gene	Sequenza 5'-3'
<i>gyrB</i>	TCGGACGCGTATGCGATATC-Fw
<i>gyrB</i>	GCGGTTTCGCTGACCTTCACCGAGATCAC-Rev

Tab. 7 - DIMENSIONE DEI FRAMMENTI OTTENUTI DA DIGESTIONE CON *RsaI*.

Specie	Dimensione dei frammenti in pb
<i>M. bovis</i> / <i>M. caprae</i>	480, 105, 100, 80
<i>M. microti</i>	660, 105
<i>M. tuberculosis</i> complex	560, 105, 100

16.2.8. IDENTIFICAZIONE A LIVELLO DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX MEDIANTE AMPLIFICAZIONE

Il rilevamento di micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex può essere effettuato mediante PCR direttamente su estratti di linfonodo sia con kit commerciali che con reazioni sviluppate *in-house*. Non può tuttavia prescindere dall'esame colturale, che è considerato il metodo di riferimento dal *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines* e dal *Report* della Direttiva 64/432/EEC.

Molti Autori suggeriscono l'utilizzo di protocolli basati sull'amplificazione specifica di una porzione dell'elemento d'inserzione IS6110 per il rilevamento di micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex in campioni di tessuto. Si propone la seguente metodica articolata su tre fasi:

- Estrazione dell'acido nucleico:
 - lisare meccanicamente un'aliquota dell'omogenato ottenuto come descritto al paragrafo 16.2.6, in presenza di 100 mg di biglie di vetro (diametro di 100-200 µm);
 - sottoporre a trattamento enzimatico con proteinasi K e purificare usando colonnine di affinità commerciali, seguendo le procedure consigliate dal produttore.
- Allestimento della reazione PCR e analisi del risultato:
 - in caso di utilizzo di PCR *end-point* si impiegano i primer EXT-I e INT-I (tab. 8); la presenza di un prodotto di amplificazione di 209 pb viene valutata tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio;
 - in caso di utilizzo di PCR *real time* si impiega, oltre ai primer EXT-I e INT-I, la sonda TaqMan: FAM-AACTCAAGGAGCACATCAGCCG-BHQ1;
 - il risultato viene valutato in base alla presenza di curve di amplificazione specifiche.

Si consiglia l'utilizzo di controlli interni per individuare la presenza di inibitori. Se aggiunti nella fase di estrazione del DNA, questi controlli permettono anche di individuare problemi associati alla fase di estrazione. Il controllo interno può essere sia esogeno, da aggiungere al campione, o endogeno, costituito da un gene presente nel genoma della specie animale che si vuole analizzare e amplificato da una coppia aggiuntiva di primer specifici.

Tab. 8 - PRIMER PER LA RICERCA DI IS6110 MEDIANTE PCR.

Oligonucleotide	Sequenza 5'-3'
EXT-I	CCCGGACAGGCCGAGTTT
INT-I	CCCCATCGACCTACTACG

BIBLIOGRAFIA

1. Abass N.A., Suleiman K.M., El Jalii IM., *Differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates by their gyrB polymorphism*, 2010, Indian J Med Microbiol; 28:26-29.
2. Abbadi S., El Hadidy G., Gomaa N., Cooksey R., *Strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex isolated from sputum of pulmonary tuberculosis patients*, 2009, Int J Infect Dis; 13:236-242.
3. de la Rua-Domenech R., *Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of zoonotic aspects of bovine tuberculosis*, 2006, Tuberculosis; 86:77-109.
4. European Food Safety Agency, *The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2009*, 2011, EFSA J; 9:2090.
5. Evans J.T., Smith E.G., Banerjee A., Smith R.M.M., Dale J., Innes J.A., Hunt D., Tweddell A., Wood A., Anderson C., Hewinson R.G., Smith N.H., Hawkey P.M., Sonnenberg P., *Cluster of human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis: evidence for person-to-person transmission in the UK*, 2007, Lancet; 369:1270-1276.
6. Grange J.M. *Mycobacterium bovis infection in human beings*, 2001, Tuberculosis; 81:71-72.
7. Huard R.C., de Oliveira Lazzarini L.C., Butler W.R., van Soolingen D., Ho J.L., *PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions*, 2003, J Clin Microbiol; 41:1637-1650.
8. Kulski K.J., Khinsoe C., Pryce T., Christiansen K., *Use of a multiplex PCR to detect and identify Mycobacterium avium and M. intracellulare in blood culture fluids of AIDS patients*, 1995, J Clin Microbiol; 33:668-674.
9. LoBue P.A., Enarson D.A., Thoen C.O., *Tuberculosis in humans and animals: an overview*, 2010, Int J Tuberc Lung Dis; 14:1075-1078.
10. Menzies F.D., Neill S.D., *Cattle-to cattle transmission of bovine tuberculosis*, 2000, Vet J; 160:92-106.
11. Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B., Hanna J., *Pathogenesis of Mycobacterium bovis infection in cattle*, 1994, Vet Microbiol; 40:41-52.
12. Riley R.L., Mills C.C., Nyka W., Weinstock N., Storey P.B., Sultan L.U., Riley M.C., Wells W.F., *Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis*, 1959, Am J Hyg; 70:185-196.
13. Rodwell T.C., Moore M., Moser K.S., Brodine S.K., Strathdee S., *Tuberculosis from Mycobacterium bovis in binational communities, United States*, 2008, Emerg Infect Dis; 14:909-916.

Capitolo 17

ELEMENTI ESSENZIALI DI MICOBATTERIOLOGIA AD USO CLINICO

**Claudio Scarparo,
Enrico Tortoli**

17. ELEMENTI ESSENZIALI DI MICOBATTERIOLOGIA AD USO CLINICO

Scopo di questo capitolo è di rispondere ad alcune delle FAQ (*Frequently Asked Questions*) emerse durante una pluriennale esperienza nel campo della micobatteriologia.

17.1. GENERALITÀ SUI MICOBATTERI

Fra le caratteristiche fenotipiche dei micobatteri quelle che hanno la maggior rilevanza sono la alcol-acido-resistenza e la lentezza di crescita.

All'osservazione microscopica i micobatteri appaiono tipicamente come bacilli alcol-acido-resistenti (BAAR); infatti, una volta colorati con particolari metodiche, sono in grado di trattenere il colorante penetrato all'interno della parete, anche dopo decolorazione energica con alcol etilico e acidi forti. Tale proprietà non è esclusiva dei micobatteri ma è condivisa da altri microrganismi, quali ad esempio nocardie, corinebatteri, *Rhodococcus* sp. (27); tuttavia, le diverse caratteristiche morfologiche consentono a un microscopista esperto di attribuire i microrganismi osservati, con un elevato grado di confidenza, al genere *Mycobacterium*. Di conseguenza, nella refertazione microscopica, la segnalazione di bacilli alcol-acido-resistenti è praticamente sinonimo di presenza di micobatteri.

I micobatteri crescono assai più lentamente della grande maggioranza dei microrganismi di interesse clinico. Sebbene la velocità di crescita delle varie specie del genere *Mycobacterium* vari notevolmente, essa è, anche nelle specie a crescita più rapida, nettamente più lenta di quella degli altri batteri; il bacillo tubercolare ha un tempo di replicazione di circa 20 ore, in questo lasso di tempo *Escherichia coli* si riproduce oltre 4000 volte. Non deve quindi stupire che le colture per micobatteri vadano incubate per tempi molto lunghi. Alcune specie addirittura non crescono sui comuni terreni per micobatteri e richiedono condizioni o *media* particolari e ancora oggi non è stato messo a punto nessun terreno capace di far crescere *Mycobacterium leprae*. La ben nota distinzione dei micobatteri in due gruppi, quelli a crescita rapida (53% delle specie) e quelli a crescita lenta (47%), è importante anche dal punto di vista clinico, differendo nettamente gli uni dagli altri per la sensibilità ai farmaci. Le specie a crescita rapida danno colonie visibili entro una settimana, quelle a crescita lenta richiedono tempi più lunghi; questo criterio tuttavia ha valore soltanto allorché la velocità di crescita sia determinata a partire da un inoculo standardizzato su terreno solido. Non è pertanto possibile dedurre la velocità di crescita in base al tempo di positivizzazione della coltura di routine; nei terreni liquidi anche micobatteri a crescita lenta, se in carica elevata, possono svilupparsi entro una settimana; per contro, specie a crescita rapida, indebolite dal trattamento decontaminante, possono richiedere per crescere ben più di 7 giorni.

Attualmente il genere *Mycobacterium* comprende oltre 140 specie, ma solo *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium ulcerans* e i membri del *Mycobacterium tuberculosis* complex sono considerati patogeni obbligati. Di certo preminente, sia dal punto di vista clinico che per i risvolti in ambito di salute pubblica, è il *Mycobacterium tuberculosis* complex, raggruppamento che include le specie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti* e "*M. canettii*".

Tali specie sono infatti responsabili della tubercolosi nell'uomo, con le sole eccezioni di *M. bovis* BCG e *M. microti*, che tuttavia possono provocarla in pazienti immunodepressi.

Delle specie micobatteriche non tubercolari, il 6% è stato isolato esclusivamente da animali, il 17% solamente dall'ambiente e il 77% anche, o esclusivamente, dall'uomo. Per ben 4/5 delle specie isolate dall'uomo esistono in letteratura *report*, in qualche caso isolati, ma più spesso ripetutamente confermati, che ne segnalano il significato patogeno.

I micobatteri non tubercolari sono organismi opportunisti che possono dare patologie in pazienti affetti da particolari condizioni predisponenti; tali patologie sono definite "micobatteriosi" per distinguerle dalla tubercolosi vera e propria. Anche all'interno dei micobatteri non tubercolari esistono dei raggruppamenti di specie che sono di notevole interesse clinico; il più importante è il *Mycobacterium avium* complex, o MAC, che include dieci specie, fra le quali le più frequenti sono *M. avium* e *M. intracellulare*. Dato che alcune specie sono più frequentemente di altre associate a malattia, diventa quindi indispensabile identificare sempre i micobatteri a livello di specie, o almeno a livello di gruppo, anche se prioritaria è per il clinico l'informazione riguardante l'appartenenza o meno dell'isolato in esame al *Mycobacterium tuberculosis* complex, informazione che deve essere comunicata con la massima tempestività. Caratteristica dei micobatteri tubercolari, a differenza di quelli non tubercolari, è infatti la trasmissione interumana (contagio) che comporta la necessità di isolamento del paziente.

I sistemi commerciali permettono attualmente ai laboratori di livello medio-alto di identificare con accuratezza le specie di più frequente isolamento; per le identificazioni più problematiche esistono in Italia alcuni Centri di Riferimento ai quali è possibile, anzi raccomandato, rivolgersi.

17.2. I CAMPIONI CLINICI

Dato che la tubercolosi può interessare ogni distretto dell'organismo, la ricerca dei micobatteri può essere eseguita su qualsiasi tipo di campione biologico purché proveniente dalla sede dell'infezione. Mentre è utile la ricerca nel sangue quando si sospettino forme disseminate e in presenza di tubercolosi miliare, l'emocoltura per micobatteri richiesta allo scopo di confermare, o escludere, un'infezione localizzata non ha alcuna base scientifica.

Poiché l'isolamento dell'agente eziologico è un elemento cruciale nella diagnosi di tubercolosi o micobatteriosi, è di fondamentale importanza che la raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni siano effettuati correttamente. Gli operatori sanitari coinvolti nella fase preanalitica devono essere consapevoli che prelievi e/o invii non appropriati hanno come conseguenza un risultato microbiologico non attendibile o fuorviante che può essere causa di mancata diagnosi, di ritardo diagnostico e di errato approccio terapeutico, con possibile importante danno per il paziente e aggravio della spesa sanitaria.

17.2.1. SUGGERIMENTI DIAGNOSTICI

I punti seguenti devono essere tenuti presenti ogniqualvolta si prenda in considerazione un'indagine microbiologica per sospetto di tubercolosi o micobatteriosi.

- La ricerca di micobatteri non è una procedura di screening e deve essere richiesta solo in presenza di un fondato sospetto clinico.

- Per la **diagnosi di tubercolosi o micobatteriosi polmonare** devono essere inviati tre campioni di espettorato spontaneo raccolti di primo mattino in giorni diversi. Qualora il paziente non riesca ad espettorare spontaneamente possono essere inviati in alternativa:
 - tre campioni di espettorato indotto raccolto dopo aerosol con soluzione salina ipertonica, possibilmente prelevati in giorni successivi in stanze dedicate (è fondamentale specificare nella richiesta la natura del campione, per evitare che possa essere scambiato per materiale salivare);
 - tre campioni di aspirato gastrico (indicati specialmente per pazienti pediatrici) o di feci (indicati soprattutto per soggetti anziani che non riescono ad espettorare), raccolti in giorni successivi;
 - un campione di lavaggio bronco-alveolare o di broncoaspirato.
- Per il **monitoraggio della terapia** nei pazienti con microscopia e coltura positiva è raccomandato l'invio di campioni solo a partire dalla terza settimana dall'inizio del trattamento; l'invio di campioni raccolti nelle due settimane successive all'inizio della terapia non ha utilità alcuna. Poiché la dimissione del paziente è generalmente subordinata alla negatività microscopica di tre campioni consecutivi, l'invio, nella stessa settimana, di un secondo (e/o di un terzo) espettorato è giustificato solo in caso di negatività del primo (e del secondo) campione. Tale raccomandazione vale anche per tutti i successivi invii previsti dal follow-up terapeutico.
- L'**emocoltura** per micobatteri può essere eseguita da sangue periferico e da aspirato midollare; nel primo caso si devono inviare in laboratorio non meno di due, e non più di tre, campioni raccolti a distanza di mezz'ora l'uno dall'altro, indipendentemente dall'andamento febbrile. Tale indagine è indicata solo nei seguenti casi:
 - soggetti immunocompetenti con sospetto di malattia disseminata e quadro radiologico di tubercolosi miliare;
 - soggetti immunodepressi con forte sospetto clinico di tubercolosi;
 - soggetti immunodepressi con forte sospetto clinico di micobatteriosi disseminata, suffragato da febbre da almeno una settimana e, nei pazienti HIV-positivi, da conta dei linfociti CD4+ < 100/mm³ e non in profilassi per *Mycobacterium avium* complex (14).
 La coltura del sangue mestruale può essere eseguita in caso di sospetto di tubercolosi a carico dell'apparato genitale femminile.

17.2.2. RACCOMANDAZIONI PER LA RACCOLTA E L'INVIO DEI CAMPIONI

Le procedure operative per una corretta raccolta dei campioni biologici sono riportate nella tabella I.

Si ricorda, in particolare, che:

- la raccolta deve essere effettuata in contenitori sterili, con tappo a vite, privi di qualsiasi sostanza fissativa o conservante;
- per evitare l'essiccamento dei frammenti biotici è consigliata l'aggiunta di una quantità adeguata di soluzione fisiologica sterile;
- la raccolta di materiale mediante tamponi è sconsigliata; nell'impossibilità di eseguire un tipo di prelievo diverso (con siringa), utilizzare più tamponi, privi di terreno di trasporto agarizzato.

- L'aggiunta, nel contenitore, di qualche mL di soluzione fisiologica sterile permette di evitare l'essiccamento del campione;
- un singolo campione, se di volume adeguato, può essere utilizzato per l'esecuzione di tutti i test diagnostici disponibili (microscopia, coltura, amplificazione);
 - nella richiesta devono essere riportati, in forma leggibile:
 - i dati anagrafici del paziente (che devono corrispondere a quelli obbligatoriamente presenti sul contenitore);
 - il tipo di materiale biologico;
 - la sede del prelievo;
 - il giorno e l'ora della raccolta;
 - il quesito diagnostico;
 - l'indicazione del reparto richiedente con un recapito telefonico;
 - prima dell'invio di un campione biologico in laboratorio deve esserne verificata l'idoneità (es. quantità di espettorato non inferiore a 5 mL; espettorato, non materiale salivare; quantità di urina non inferiore a 50 mL);
 - i campioni devono pervenire in laboratorio entro 30-60 minuti dalla raccolta. Qualora ciò non sia operativamente possibile, l'invio deve essere garantito entro 24 ore dal prelievo; fino al momento del trasporto il campione deve essere conservato in frigorifero e non congelato. Fanno eccezione soltanto le emocolture che devono essere conservate a temperatura ambiente;
 - per la spedizione dei campioni devono essere seguite le modalità previste dalla Circolare del Ministero della Sanità n. 16 del 20/07/94.

Tab. I - PROCEDURE OPERATIVE PER LA RACCOLTA DEI CAMPIONI BIOLOGICI PER LA RICERCA DEI MICOBATTERI.

Tipo di campione	Requisiti	Istruzioni speciali	Campioni non idonei
Aspirato gastrico	≥5-10 mL raccolto al mattino, dopo almeno 8 ore di digiuno, per 3 giorni consecutivi	Neutralizzare (pH 7) con carbonato di sodio	Campioni non neutralizzati
Broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare, spazzolatura bronchiale, aspirato trans-tracheale	≥3 mL	Disinfettare accuratamente il broncoscopio	
Espettorato	5-10 mL raccolto al mattino da espettorazione profonda, per 3 giorni consecutivi	Istruire il paziente su come espettorare correttamente	Saliva; pool di campioni
Espettorato indotto	5-10 mL raccolto al mattino, per 3 giorni consecutivi	Specificare chiaramente nella richiesta, e sul contenitore, che si tratta di espettorato indotto	

SEGUE →

Tipo di campione	Requisiti	Istruzioni speciali	Campioni non idonei
Feci	Almeno 1 g in contenitore senza conservanti	Per la diagnosi di tubercolosi intestinale ricorrere al prelievo biotico	
Linfonodo	Linfonodo o porzione di esso in contenitore sterile, senza fissativi o conservanti	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in formalina o altri fissativi; campioni inclusi in paraffina
Liquidi cavitari: pleurico, pericardico, peritoneale, ecc.	10-15 mL in provetta sterile (con citrato trisodico)	Per la diagnosi di pleurite tubercolare sono più indicati biopsia pleurica ed espettorato	
Liquor	≥2 mL		
Materiale da lesioni cutanee	La massima quantità possibile	Utilizzare tamponi senza terreno di trasporto agarizzato solo se non è possibile eseguire il prelievo con siringa o biopsia	Tamponi con terreno di trasporto agarizzato
Materiali necrotico-ascessuali	La massima quantità possibile in siringa con copriago	Se non è possibile usare la siringa utilizzare più tamponi senza terreno di trasporto agarizzato e inserirli in un contenitore sterile con una piccola quantità di fisiologica sterile	
Midollo emopoietico	La massima quantità possibile, direttamente nel flacone da emocoltura, o in provetta con eparina o in provetta Isolator		Campione coagulato; campione in provetta con EDTA
Prelievi tissutali e biopsie	Almeno 1 g di tessuto in contenitore senza fissativi o conservanti	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in formalina o altri fissativi; campioni inclusi in paraffina
Sangue mestruale	Alcuni mL, raccolti al 2°-3° giorno del flusso mestruale, in provetta con eparina	Preferibile eseguire curettage dell'endometrio	Sangue coagulato
Sangue periferico	Direttamente nel flacone da emocoltura, o in provetta con eparina o in provetta Isolator	2 o 3 campioni, prelevati a distanza di 30 minuti uno dall'altro, indipendentemente dall'andamento febbrile	Sangue coagulato; sangue in provetta con EDTA
Urine	La prima urina del mattino, ottenuta anche mediante cateterizzazione (almeno 50 mL), per 3 giorni consecutivi	Il mitto intermedio è sconsigliato	Urine delle 24 ore; urine da sacca, volumi inferiori a 50 mL

17.3. L'ESAME MICROSCOPICO

La ricerca microscopica di bacilli alcol-acido-resistenti in un campione clinico è il test microbiologico più rapido ed economico in grado di evidenziare, con elevata probabilità, un'infezione da micobatteri.

La sensibilità del test è tuttavia piuttosto bassa, dal momento che è necessaria la presenza di circa 5000-10.000 micobatteri per mL di materiale biologico perché risultino rilevabili (20). Se paragonata a quella dell'esame colturale, la sensibilità dell'esame microscopico può oscillare fra il 22% e il 78% (9); tale variabilità dipende dal tipo di campione, dalla prevalenza della tubercolosi (o delle micobatteriosi) in una data popolazione, dalla metodica utilizzata e, non ultimo, dall'esperienza di chi legge il vetrino.

L'esame microscopico non è specifico per il bacillo tubercolare ma risulta positivo anche in presenza di micobatteri non tubercolari e di altri organismi alcol-acido-resistenti. Occorre tuttavia sottolineare che, in presenza di positività, la probabilità che ci si trovi di fronte a microrganismi diversi dai micobatteri è trascurabile e che, mediamente, solo nel 5% dei casi la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti è imputabile a micobatteri non tubercolari. Infatti, diversamente dalla tubercolosi, non è molto frequente che una micobatteriosi sia caratterizzata da cariche batteriche abbastanza alte da risultare rilevabili microscopicamente.

L'indagine microscopica può essere eseguita su tutti i materiali, ma non è utile la ricerca su sangue in cui la carica batterica, in caso di batteriemia, è praticamente sempre inferiore alla soglia di sensibilità del metodo.

Il preparato microscopico dovrebbe essere eseguito previa centrifugazione del campione clinico, dato che tale procedura aumenta la sensibilità di circa il 20% rispetto all'esecuzione diretta senza centrifugazione (2).

Il risultato di un esame microscopico deve essere refertato entro 24 ore lavorative dal ricevimento del campione. Sollecitazioni per ottenere il referto in tempi più brevi possono essere giustificate soltanto dalla necessità di predisporre rapidamente l'isolamento del paziente; va ricordato tuttavia che la mascherina respiratoria di tipo chirurgico è progettata per prevenire il rilascio nell'aria delle secrezioni respiratorie, e che un paziente che la indossi, istruito ad osservare regole di igiene respiratoria e particolari procedure nel tossire (19), può essere gestito in sicurezza in qualsiasi reparto per il tempo necessario all'emissione del referto.

Il referto di un esame microscopico positivo per bacilli alcol-acido-resistenti deve sempre essere comunicato tempestivamente al clinico e riportare un'indicazione semiquantitativa (tab. 2), che fornisce importanti indicazioni:

- sulla contagiosità e conseguentemente sulla necessità di isolamento del paziente, dal momento che il rischio di trasmissione dell'infezione è direttamente correlato al numero di micobatteri presenti nell'escreato;
- sul follow-up terapeutico, in quanto una terapia efficace determina una progressiva riduzione della carica micobatterica.

Non è possibile, in base all'osservazione dei caratteri morfologici dei bacilli alcol-acido-resistenti, risalire a un'identificazione di specie, sia pure approssimativa. È tuttavia possibile, nei casi in cui la morfologia sia tipicamente cocco-bacillare, escluderne l'appartenenza al *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Ogni qualvolta si riscontri una positività microscopica in un nuovo paziente è utile l'esecuzione del test di amplificazione genica sul campione per determinare o escludere l'appartenenza dei bacilli alcol-acido-resistenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex.

L'esame microscopico trova il suo imprescindibile complemento nell'esame colturale, dato che i pregi dell'uno compensano i limiti dell'altro (il primo è rapido ma poco sensibile, il secondo è sensibile ma lento), ed è doveroso, da parte del microbiologo, eseguire comunque sempre entrambi in presenza di una richiesta mirata alla ricerca di micobatteri. Non è superfluo ricordare che l'esecuzione del solo esame microscopico non permette né di identificare i micobatteri presenti, né di testarne la sensibilità ai farmaci.

Nella maggior parte dei casi i risultati dell'esame microscopico e di quello colturale concordano; non sono tuttavia rare le discordanze. La microscopia negativa, abbinata a una coltura positivizzata generalmente dopo incubazione prolungata, è imputabile alla scarso numero di micobatteri presenti nel campione non rilevabili a causa della bassa sensibilità dell'esame microscopico.

La microscopia positiva non seguita dalla crescita in coltura si registra di solito nei pazienti trattati per lungo tempo; in questo caso i micobatteri osservati al microscopio sono quasi sempre non vitali.

Quest'ultimo tipo di incongruenza si riscontra talvolta anche sui materiali purulenti, probabilmente perché i micobatteri, pur vitali, essendo fagocitati dai macrofagi, hanno difficoltà a moltiplicarsi. Inoltre particolari specie di micobatteri tubercolari, quali *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium bovis*, o non tubercolari, quali *Mycobacterium genavense* e *Mycobacterium haemophilum*, possono crescere stentatamente o non crescere affatto sui terreni di coltura convenzionali.

Tab. 2 - SCHEMA DI REFERTAZIONE DELL'ESAME MICROSCOPICO IN BASE AL NUMERO DI BACILLI ALCOL-ACIDO-RESISTENTI OSSERVATI PER CAMPO MICROSCOPICO (A DIVERSI INGRANDIMENTI E UTILIZZANDO DIVERSI TIPI DI COLORAZIONE).

Colorazione con:			Referto
carbolfucsina (100x)	auramina (20x)	auramina (40x)	
0	0	0	Negativo
1-2 per 300 campi	1-2 per 30 campi	1-2 per 70 campi	Rari bacilli alcol-acido-resistenti (richiedere altro campione per controllo) ^a
1-9 per 100 campi	1-9 per 10 campi	2-18 per 50 campi	Positivo +
1-9 per 10 campi	1-9 per campo	4-36 per 10 campi	Positivo ++
1-9 per campo	10-90 per campo	4-36 per campo	Positivo +++
>9 per campo	>90 per campo	>36 per campo	Positivo ++++

^a Se non si tratta di paziente con precedente positività.

17.4. L'ESAME CULTURALE

La finalità dell'esame colturale è di far sì che i microrganismi eventualmente presenti in un campione clinico si moltiplichino *in vitro* raggiungendo cariche elevate agevolmente rilevabili. La coltura è ancora oggi l'esame per la diagnostica microbiologica di tubercolosi e micobatteriosi dotato della sensibilità più elevata, chiaramente superiore non solo a quella dell'esame microscopico, ma anche a quella dei test di amplificazione genica. La coltura riesce a mettere in evidenza un numero di bacilli per mL di campione circa 100 volte inferiore rispetto alla microscopia.

La coltura può essere eseguita su qualsiasi campione proveniente dal distretto sospettato di essere sede di infezione e costituisce un passaggio fondamentale per l'identificazione dei micobatteri presenti e per la determinazione della loro farmaco-sensibilità.

La coltura non è specie-specifica, non è quindi necessario orientare la ricerca verso il *Mycobacterium tuberculosis* complex o piuttosto verso i micobatteri non tubercolari. È tuttavia fondamentale la segnalazione al laboratorio:

- di un preciso sospetto clinico per le infezioni in cui possono essere implicate alcune specie esigenti (*Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium haemophilum*), le cui possibilità di isolamento dipendono dall'utilizzo di terreni di coltura e/o temperature di crescita particolari;
- dei prelievi di origine cutanea, poiché le colture di tali campioni richiedono incubazione a temperature più basse dell'usuale.

L'identificazione di un ceppo micobatterico isolato in coltura è sempre indispensabile; le caratteristiche fenotipiche possono tuttavia consentire di escludere l'appartenenza al *Mycobacterium tuberculosis* complex di un isolato che presenti colonie pigmentate, o di assegnare presuntivamente un ceppo alla specie *Mycobacterium tuberculosis*, quando il preparato microscopico, eseguito per confermare la positività di una coltura in terreno liquido, riveli la presenza di fasci e cordoni caratteristici (fig. 17.1).

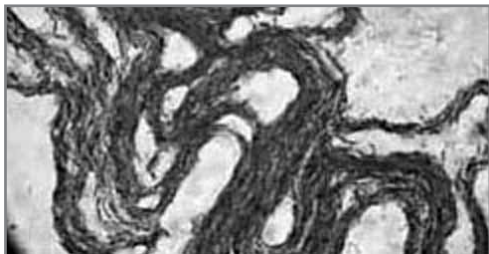


Fig. 17.1 - FASCI DI MICOBATTERI SVILUPPATISI IN TERRENO LIQUIDO.

Il limite maggiore dell'esame colturale è costituito dalla necessità di lunghi tempi di incubazione, dovuti alla lentezza di crescita dei micobatteri; una coltura dovrebbe essere considerata negativa non prima di 8 settimane. È dunque facilmente comprensibile l'opportunità di affiancare alla coltura un test rapido come la microscopia. La richiesta del solo esame colturale non è quindi motivata ed è doveroso, per il microbiologo, eseguire l'esame microscopico e l'esame colturale ogniqualvolta sia richiesta la ricerca di micobatteri.

Diversamente da quanto accade per altri microrganismi, la coltura per micobatteri non può essere eseguita semplicemente inoculando il materiale in esame in un idoneo terreno di coltu-

ra. Infatti, ad esclusione di materiali particolari normalmente sterili, quali ad esempio il liquido cefalo-rachidiano e i liquidi cavitari, i campioni in cui si ricercano abitualmente i micobatteri sono contaminati da flora residente che, se non eliminata, può svilupparsi rapidamente sul terreno di coltura precludendo ogni possibilità di crescita ai micobatteri eventualmente presenti. La procedura di eliminazione della flora residente, definita “decontaminazione”, si basa sull’impiego di sostanze capaci di uccidere i contaminanti ma, allo stesso tempo, non lesive per i micobatteri. La decontaminazione dei campioni pesantemente contaminati può risultare problematica e talvolta impossibile; è pertanto importante che la raccolta del campione sia effettuata nel modo più sterile possibile e che il laboratorio venga avvertito nel caso in cui il prelievo di un campione normalmente sterile non sia stato eseguito asepticamente. Non esistendo un decontaminante ideale, capace di eliminare totalmente la flora residente e non lesivo affatto per i micobatteri, è del tutto normale che alcune colture risultino contaminate e che altre risultino falsamente negative, in quanto i micobatteri presenti non riescono a moltiplicarsi perché indeboliti dal decontaminante. Di norma il numero delle colture contaminate deve oscillare fra il 3% e il 5%; percentuali più basse sono indice di lesività del processo di decontaminazione, mentre percentuali più alte si registrano a seguito di trattamenti troppo blandi (10, 20).

Per quanto riguarda il riscontro di discordanze fra il risultato della coltura e della microscopia vale quanto detto in precedenza, con l’esame microscopico che può evidenziare micobatteri non vitali nei pazienti in terapia, ed, essendo meno sensibile, può risultare falsamente negativo in campioni paucibaccillari o in presenza di specie particolarmente esigenti non in grado di crescere sui normali terreni di coltura.

Per un ottimale isolamento dei micobatteri è fortemente raccomandata l’esecuzione dell’esame colturale sia su terreno solido che in terreno liquido. Anche se normalmente i micobatteri crescono bene in entrambi i tipi di terreno, il terreno liquido consente una riduzione media dei tempi di isolamento di circa 10 giorni e permette di rispettare i tempi di refertazione (7-15 giorni per il bacillo tubercolare) raccomandati dai Centers for Disease Control and Prevention. Talvolta la coltura risulta positiva solo in terreno liquido, ma non mancano i ceppi, appartenenti sia a specie tubercolari che non tubercolari, che crescono solo sui terreni solidi. Per di più l’impiego di due diversi terreni di coltura consente, oltre al recupero dei ceppi che riescono a svilupparsi su uno solo di essi, anche di portare comunque a buon fine quelle colture che risultano contaminate in uno solo.

I tempi di incubazione differiscono fra i due tipi di terreno, normalmente 6 settimane per quelli liquidi e 8 per quelli solidi; la risposta di negatività va data di norma soltanto allo scadere dell’ottava settimana. Nella pratica la quasi totalità delle colture positive risultano tali nel primo mese di incubazione, nelle settimane successive la probabilità di positività diventa invece minima. Il tempo impiegato da una coltura per positizzarsi fornisce un’informazione analoga a quella della valutazione semiquantitativa della carica batterica nell’esame microscopico; una crescita precoce è indice di elevata carica batterica nel campione biologico. Nei pazienti in terapia, i tempi di positività tendono ad allungarsi per effetto della riduzione della carica e della vitalità dei micobatteri.

17.4.1. LE CROSS-CONTAMINAZIONI DI LABORATORIO

Le colture per micobatteri possono essere soggette a cross-contaminazioni in laboratorio con una frequenza stimata attorno al 2% (18). Si tratta dei casi in cui la coltura di un campione negativo

presenta, a seguito di contaminazioni verificatesi in laboratorio, crescita di micobatteri. Tali contaminazioni non sono dovute quasi mai a errori grossolani (scambio di campioni), bensì al trasporto accidentale, durante la processazione, di impercettibili quantità di un campione positivo nel contenitore di un campione negativo. La frequenza delle cross-contaminazioni è più elevata nei laboratori che processano grossi numeri di campioni, ma non ci sono laboratori che possano ritenersi immuni. Indispensabile, per l'individuazione dei casi, è la segnalazione al microbiologo da parte del clinico delle positività totalmente inattese. Fermo restando che si tratta di errori di laboratorio, è innegabile che almeno i casi che vengono alla luce sono relativi a campioni inviati in assenza di fondato sospetto clinico e, quindi, a richieste non motivate.

Oggi, grazie alle tecniche di genotipizzazione che permettono di differenziare singoli ceppi, è possibile dirimere qualsiasi dubbio; il ricorso ai laboratori che utilizzano tali tecnologie è quindi doveroso, non solo nell'interesse del paziente, ma anche in quello del clinico e del microbiologo.

17.5. AMPLIFICAZIONE GENICA

Le tecniche di biologia molecolare non ricercano direttamente i microrganismi bensì le sequenze specifiche di acido nucleico presenti nel loro genoma. Il rilevamento di tali molecole direttamente nei campioni clinici è possibile solo previa amplificazione, un processo ciclico capace di produrre, in tempi brevi, milioni di repliche del frammento di acido nucleico bersaglio anche se presente, teoricamente, in singola copia. La più conosciuta di tali tecniche, nonché la prima ad essere stata utilizzata, è la *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Pur essendo applicabile a qualsiasi specie di micobatteri, la ricerca diretta su campioni clinici mediante amplificazione genica è utilizzata in micobatterioLOGIA quasi esclusivamente per i microrganismi appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex, all'interno del quale non è tuttavia in grado di differenziare le singole specie. La ricerca di sequenze specifiche per i micobatteri non tubercolari non è applicata nei comuni laboratori, perché il numero delle specie che i metodi commerciali sono in grado di rilevare è estremamente limitato.

La rapidità di risposta è certamente la prerogativa più importante dei test di amplificazione; la possibilità di disporre di risultati in 24-48 ore ha infatti un impatto diagnostico particolarmente significativo in presenza di organismi caratterizzati da crescita lenta, quali i micobatteri. Questo si traduce in un miglior controllo della malattia tubercolare, riducendo la diffusione dell'infezione e allo stesso tempo i costi associati all'isolamento e al trattamento del paziente.

I diversi test commerciali, considerati complessivamente, hanno dimostrato una sensibilità media dell'85,5% e una specificità del 97% (15, 21). I dati relativi alla sensibilità sono tuttavia estremamente variabili; per i campioni respiratori microscopico-positivi essa varia fra il 90% e il 100%, mentre per quelli microscopico-negativi i valori si abbassano significativamente e risultano compresi nel range 50-80% (15, 28). Per tale motivo l'uso dei test di amplificazione genica non deve prescindere in nessun caso dalla contemporanea esecuzione di esame microscopico e colturale che il microbiologo è tenuto ad eseguire anche in caso di richiesta della sola amplificazione, privilegiando i primi rispetto alla seconda in caso di materiale insufficiente.

La maggior parte dei sistemi di amplificazione commerciali sono validati esclusivamente per l'uso sui campioni respiratori e i CDC hanno avallato nel 1996 tale limitazione, motivandola con

la mancanza di dati che ne dimostrino la validità anche sui materiali extrapolmonari (4, 5, 7). Dopo più di un decennio, sulla base del discreto numero di lavori pubblicati, si può affermare che per i campioni non respiratori la sensibilità dei sistemi di amplificazione è accettabile, anche se risulta inferiore rispetto a quella dei campioni respiratori. L'impiego dei test di amplificazione sui campioni non respiratori, nei confronti dei quali anche la coltura è meno sensibile, può aiutare a dirimere quesiti di diagnosi altrimenti problematici; tuttavia, in considerazione della raccomandazione delle ditte produttrici a limitarne l'uso ai materiali respiratori, il loro utilizzo dovrebbe essere deciso di comune accordo fra microbiologo e clinico.

Non essendo i test di amplificazione test di screening, il loro impiego deve essere limitato ai casi con sospetto di malattia tubercolare attiva suffragato da evidenze cliniche e/o radiologiche.

Per la loro stessa natura, i test di amplificazione degli acidi nucleici non sono legati alla vitalità del microrganismo e possono rimanere positivi anche dopo la negativizzazione colturale e perfino dopo il completamento della terapia; devono quindi essere utilizzati esclusivamente in fase diagnostica e non nel follow-up terapeutico (24). Sarebbe preferibile che il microbiologo evitasse di eseguirli, anche se richiesti, su campioni provenienti dal distretto corporeo in cui, allo stesso paziente, la tubercolosi risulti essere stata già diagnosticata microbiologicamente. Sono utili invece, anche in pazienti in terapia, per diagnosticare la malattia in sedi diverse da quella accertata.

Pur lavorando in condizioni ottimali e usando tutti gli accorgimenti tecnici raccomandati, la possibilità che i test di amplificazione risultino falsamente positivi o falsamente negativi non può essere esclusa.

I falsi positivi, fortunatamente rari, sono conseguenza di cross-contaminazioni di laboratorio; le grandi quantità di acido nucleico bersaglio prodotte durante il processo di amplificazione possono infatti contaminare l'ambiente di lavoro e, successivamente, nuovi campioni. Un netto abbassamento della frequenza delle contaminazioni si è registrato in seguito all'introduzione dell'automazione in biologia molecolare. La possibilità di risultati falsamente positivi a seguito di cross-amplificazione di micobatteri non tubercolari, documentata solo in rarissimi casi, incide sulla specificità in maniera trascurabile. Non sempre tuttavia il risultato positivo dell'amplificazione in presenza di colturale negativo va interpretato come falsa positività. In tali casi il peso del dato clinico diviene determinante; vi sono inoltre specie all'interno del *Mycobacterium tuberculosis* complex, quali *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*, che possono crescere stentatamente o non crescere affatto sui normali terreni di coltura pur essendo regolarmente rilevate dal test molecolare.

Molteplici sono le cause potenzialmente responsabili di false negatività, le principali sono:

- la difficoltà di ottenere un'ottimale estrazione dell'acido nucleico da organismi con parete cellulare particolarmente robusta quale quella dei micobatteri;
- la distribuzione non omogenea dei bacilli all'interno del campione;
- la presenza di inibitori.

Gli inibitori sono sostanze non ancora identificate in grado di inattivare gli enzimi responsabili della polimerizzazione dei nucleotidi e di bloccare, di conseguenza, il processo di amplificazione. Non esistono per il momento procedure in grado di neutralizzarli, ma la loro presenza è oggi rilevabile grazie all'utilizzo di controlli interni di amplificazione. Sulla base dei dati della letteratura si stima che inibitori siano presenti in circa il 5% dei campioni. Un campione negativo all'amplificazione, in cui sia stata evidenziata la presenza di inibitori, è da considerarsi "indeterminato", dal momento

che la sua negatività potrebbe essere dovuta tanto all'assenza dell'acido nucleico bersaglio quanto all'azione degli inibitori. In questi casi il test può essere ripetuto dopo aver diluito il campione (la diluizione, pur riducendo inevitabilmente la concentrazione dell'acido nucleico bersaglio eventualmente presente, riesce in molti casi a inattivare l'azione degli inibitori) o su un nuovo prelievo.

Risulta pertanto evidente che il risultato dell'amplificazione genica in micobatteriologia non è facilmente interpretabile e che l'affidabilità del test non è paragonabile a quella relativa ad altri microrganismi. Per tale motivo i CDC hanno redatto un algoritmo interpretativo che prevede l'analisi di tre campioni di escreato prelevati in tre giorni diversi (5, 7):

- nel paziente con microscopia negativa su tutti e tre i campioni di escreato (fig. 17.2):
 - se il test di amplificazione, eseguito su due campioni, è positivo, la diagnosi di tubercolosi è da ritenersi molto probabile;
 - se il test di amplificazione, eseguito su almeno due campioni, è negativo, il paziente è considerato convenzionalmente non infettivo, ma la possibilità di una tubercolosi attiva non può essere esclusa;
 - se il test di amplificazione, eseguito su due campioni, dà risultati contrastanti, il test deve essere considerato non interpretabile ai fini clinici e il clinico deve basarsi su altri elementi (richiedendo eventualmente ulteriori indagini diagnostiche) per decidere se isolare e/o trattare il paziente;

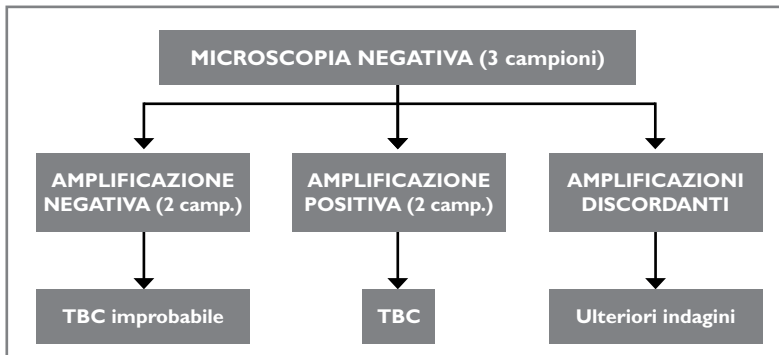


Fig. 17.2
INTERPRETAZIONE DEL
TEST DI AMPLIFICAZIONE
IN PRESENZA DI
MICROSCOPIA NEGATIVA.

- nel paziente con microscopia positiva in almeno uno dei tre campioni di escreato (fig. 17.3):
 - se il test di amplificazione è positivo (un solo campione è sufficiente) è possibile far diagnosi di tubercolosi aperta;
 - se il test di amplificazione, eseguito su almeno due campioni, è negativo e se:
 - sono presenti inibitori, il test deve essere considerato indeterminato e il clinico deve basarsi su altri elementi (richiedendo eventualmente ulteriori indagini diagnostiche) per decidere se isolare e/o trattare il paziente;
 - non sono presenti inibitori, è ragionevole ipotizzare una infezione da micobatteri non tubercolari.

A quanto appena detto si aggiungono le indicazioni dell'OMS che escludono che il risultato positivo di un test di amplificazione sia, da solo, criterio sufficiente per supportare la denuncia di un caso di tubercolosi (30).

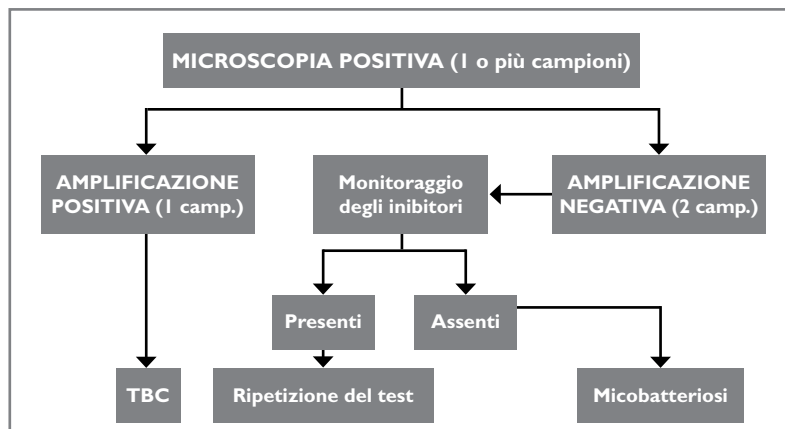


Fig. 17.3
INTERPRETAZIONE DEL
TEST DI AMPLIFICAZIONE
IN PRESENZA DI
MICROSCOPIA POSITIVA.

17.6. IDENTIFICAZIONE

A livello identificativo, l'informazione clinicamente più importante e urgente è la distinzione tra *Mycobacterium tuberculosis* complex e micobatteri non tubercolari; ciò non toglie che l'identificazione di specie sia un obiettivo da perseguire per tutti gli stipti isolati.

I sistemi di identificazione disponibili sono distinguibili in due grandi categorie, quelli fenotipici, basati sull'analisi delle caratteristiche biochimiche e colturali o sull'analisi della componente lipidica della parete cellulare, e quelli genotipici, basati sul rinvenimento, all'interno del genoma del microrganismo in esame, di particolari sequenze specie-specifiche. Anche se la scelta del sistema di identificazione è di competenza del microbiologo, il clinico deve essere a conoscenza che i risultati dei test genotipici, di gran lunga i più rapidi, sono generalmente molto affidabili, mentre quelli ottenuti soltanto su base fenotipica, in particolare utilizzando i test biochimico-colturali (che richiedono varie settimane di incubazione), sono in molti casi approssimativi e comunque attribuiscono sistematicamente i micobatteri "nuovi" o rari alla più "simile" delle specie meglio conosciute.

17.7. IL TEST DI SENSIBILITÀ

17.7.1. TEST DI SENSIBILITÀ PER *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX

Il test di sensibilità deve essere eseguito su tutti i ceppi di primo isolamento e deve essere ripetuto se il paziente continua a produrre campioni positivi all'esame colturale dopo due o tre mesi di trattamento o se le colture tornano a positizzarsi dopo un periodo di risultati colturali negativi.

L'esigenza dell'esecuzione sistematica del test di sensibilità su tutti i ceppi del *Mycobacterium tuberculosis* complex è legata alla diffusione crescente delle resistenze, siano esse singole o multiple.

Si definiscono MDR (*multidrug resistant*) i ceppi resistenti ad almeno rifampicina e isoniazide, i farmaci di gran lunga più importanti per la terapia della tubercolosi; vengono invece definiti XDR (*extensively drug resistant*) i ceppi MDR resistenti anche ad almeno uno degli antitubercolari di seconda linea iniettabili (amikacina, capreomicina e kanamicina) e ad almeno uno dei fluorochinoloni attivi sui micobatteri (ciprofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e ofloxacina).

Il test di sensibilità iniziale deve includere i farmaci di prima scelta, costituiti da etambutolo, isoniazide, pirazinamide e rifampicina. La collocazione della streptomina, considerata fino a qualche anno fa antibiotico di prima linea, è oggi controversa, essendo stata declassata a farmaco di seconda scelta dai CDC (1) ma non dall'OMS (30). Il suo inserimento nell'antibiogramma ha quindi un senso solo per i laboratori a cui afferiscono reparti che includono la streptomina nel loro protocollo terapeutico.

Nei micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex non esistono meccanismi di trasmissione trasversale (tramite plasmidi) delle resistenze; queste sono infatti esclusivamente di natura cromosomica. I ceppi che non sono mai venuti in contatto con farmaci antitubercolari (indicati come ceppi *wild type*) sono di norma sensibili a tali molecole anche se, all'interno di ogni singola popolazione *wild type*, è sempre presente una quota di mutanti resistenti, la cui frequenza oscilla, a seconda dei farmaci, fra $1/10^6$ e $1/10^8$. In assenza di trattamento tale esigua percentuale di mutanti non subisce variazioni; in presenza di terapie non corrette basate su un solo farmaco o in caso di mancata *compliance* da parte del paziente, i rapporti di forza possono cambiare rapidamente.

Ciò non implica che i ceppi isolati da pazienti mai trattati con antitubercolari siano necessariamente sensibili; non lo sono nel caso in cui l'infezione sia stata contratta per contatto con un paziente affetto da una forma resistente. Tale situazione è definita "resistenza secondaria".

Le linee guida internazionali raccomandano che il referto del test di sensibilità sia disponibile entro un mese dall'arrivo in laboratorio del campione clinico; tali tempi possono essere rispettati solo dai laboratori che utilizzano terreni liquidi sia per la coltura che per il test di sensibilità (tab. 3). L'esecuzione del test su terreno solido a base di uovo non è raccomandabile, perché non in grado di fornire risultati in tempi utili e perché difficilmente standardizzabile.

L'allargamento dell'antibiogramma ai farmaci di seconda scelta (amikacina, capreomicina, ofloxacina, moxifloxacina, etionamide, kanamicina, linezolid, pAS e rifabutina) è giustificato solo per i ceppi MDR oppure in caso di resistenza singola a rifampicina; il test deve essere eseguito esclusivamente presso Centri di Riferimento.

L'inserimento nel test di sensibilità ai farmaci di seconda linea di molecole diverse da quelle sopra riportate è attualmente privo di qualsiasi base scientifica avendo gli sporadici *report* reperibili in letteratura carattere meramente anedddotico.

Tab. 3 - TEMPI MASSIMI DI REFERTAZIONE DELLE DIVERSE INDAGINI PER LA RICERCA DI *M. TUBERCULOSIS* COMPLEX (7).

Indagine	Tempo massimo di refertazione
Esame microscopico	24 ore
Amplificazione degli acidi nucleici	48 ore
Esame colturale positivo	14 giorni
Identificazione del ceppo isolato	21 giorni
Test di sensibilità (farmaci di prima linea)	30 giorni
Test di sensibilità (farmaci di seconda linea)	4 settimane dalla richiesta

17.7.2. LE RESISTENZE DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX IN ITALIA

La resistenza di gran lunga più diffusa in tutto il mondo è quella nei confronti dell'isoniazide; secondo gli ultimi dati relativi al 2010, nel nostro Paese la sua frequenza è del 10,8%. La resistenza alla rifampicina è molto meno frequente e si aggira in Italia attorno al 4,3%. Dato che essa si associa assai spesso alla resistenza all'isoniazide e che rari sono i casi in cui si manifesta da sola, essa può essere considerata un affidabile marker di multiresistenza. Le percentuali di resistenza a etambutolo sono del 2,9%, mentre quelle relative alla streptomicina sono del 9,0%. Un caso particolare è quello delle specie *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium bovis* BCG caratterizzate da resistenza intrinseca alla pirazinamide.

I ceppi MDR hanno in Italia un'incidenza pari al 3,4% e interessano prevalentemente pazienti provenienti da Stati dell'ex Unione Sovietica e del Sudest asiatico; i ceppi di XDR sono al momento estremamente rari (13).

17.7.3. RICERCA DEI MARKER DI RESISTENZA DEL *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX

Negli ultimi anni sono state identificate, all'interno del genoma del bacillo tubercolare, alcune mutazioni associate alla resistenza nei confronti di singoli farmaci. Il ritrovamento, mediante tecniche di biologia molecolare, di tali mutazioni nel DNA del micobatterio in esame permette di predirne la resistenza a uno o più farmaci in poche ore, senza dover attendere i lunghi tempi dell'antibiogramma colturale. Sfortunatamente non è vero il contrario, in quanto l'assenza di una mutazione rilevabile non sempre si accompagna a sensibilità al farmaco in questione.

Mutazioni associate alla resistenza sono state individuate per tutti i farmaci antitubercolari di prima linea. Per quanto riguarda etambutolo e pirazinamide sono state identificate mutazioni presenti in poco più del 70% dei ceppi resistenti. nettamente migliore è la situazione relativa alla rifampicina, per la quale le mutazioni nel *locus rpoB* hanno una copertura che si avvicina al 97%. Nel caso dell'isoniazide è possibile, ricercando le mutazioni dei *loci katG* e *inhA*, arrivare a predire la resistenza in circa il 90% dei casi.

Allo stato attuale, l'analisi delle resistenze a livello genotipico risulta utile soprattutto per quanto riguarda rifampicina e isoniazide. Sono commercialmente disponibili tuttavia anche test per la valutazione della resistenza ai farmaci di seconda scelta (fluorochinoloni, amikacina, kanamicina, capreomicina). La loro sensibilità non è ottimale e, comunque, il loro utilizzo deve essere limitato ai ceppi MDR oppure resistenti alla rifampicina.

Rispetto al saggio tradizionale, l'indagine molecolare permette di accorciare notevolmente i tempi per l'instaurazione di una terapia mirata, ma trova il suo limite nell'impossibilità di poter prescindere dall'esecuzione dell'antibiogramma classico che è in grado di mettere in evidenza anche resistenze non correlate a mutazioni note.

Data la bassa frequenza delle resistenze in Italia, il rapporto costo/beneficio del saggio genotipico usato in maniera indiscriminata risulta ingiustificatamente elevato; ben diversa è invece la valutazione quando venga applicato nell'ambito di gruppi ad alto rischio di resistenza, quali i pazienti:

- provenienti da Paesi ad elevata incidenza di resistenze;
- con storia di precedenti trattamenti antitubercolari;
- contatti di pazienti MDR;
- ritrattati dopo fallimento terapeutico.

17.7.4. L'ANTIBIOGRAMMA PER I MICOBATTERI NON TUBERCOLARI

Premesso che, nei casi, e sono la maggioranza, in cui l'isolamento di un micobatterio non tubercolare è privo di significatività clinica, il trattamento del paziente non è giustificato e ancora meno lo è l'esecuzione dell'antibiogramma, è doveroso ricordare che per i micobatteri non tubercolari non esistono metodiche standardizzate per il saggio della sensibilità ai farmaci.

I criteri dell'American Thoracic Society (16) prevedono, per l'attribuzione di significatività clinica all'isolamento di un micobatterio non tubercolare, che:

- il quadro clinico sia compatibile con un'infezione micobatterica e che non esista nessun'altra possibile causa infettiva;
- il micobatterio in questione sia stato isolato:
 - da almeno due campioni di escreato, o
 - da almeno un campione di broncoaspirato o di lavaggio bronco-alveolare, o
 - da una biopsia con caratteristiche istopatologiche patognomiche, o
 - da almeno un campione di escreato, broncoaspirato o lavaggio bronco-alveolare associato a una biopsia con caratteristiche istopatologiche patognomiche.

Recentemente il CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (8) ha stabilito che la sensibilità possa essere determinata, in centri qualificati e in casi selezionati, anche su alcune specie di micobatteri non tubercolari. Molti laboratori sono soliti eseguire indiscriminatamente l'antibiogramma sui micobatteri non tubercolari utilizzando procedura e farmaci destinati al *Mycobacterium tuberculosis* complex. Essendo dimostrato che non esiste alcuna correlazione fra i risultati dei test *in vitro* e la reale efficacia dei farmaci *in vivo*, questa pratica risulta del tutto priva di utilità per il clinico e potenzialmente nociva per il paziente (29). Le raccomandazioni del CLSI prevedono che il saggio di sensibilità possa essere eseguito utilizzando la microdiluizione in brodo per determinare le concentrazioni minime inibenti, limitatamente alle specie e ai farmaci di seguito riportati.

17.7.4.1. MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX (MAC)

È indicato solo il saggio dei macrolidi (usando la claritromicina come rappresentante di classe) e solo se il paziente:

- è stato trattato in precedenza con macrolidi, o
- presenta batteriemia da MAC in corso di profilassi con macrolidi, o
- presenta una recidiva dell'infezione da MAC in corso di terapia con macrolidi.

Se le condizioni del paziente non migliorano nonostante la terapia, e le colture non si negativizzano, l'antibiogramma deve essere ripetuto:

- dopo tre mesi nelle infezioni disseminate;
- dopo sei mesi nella malattia polmonare cronica.

17.7.4.2. MYCOBACTERIUM KANSASII

I farmaci solitamente utilizzati in terapia sono rifampicina, isoniazide ed etambutolo, anche se la rifabutina sostituisce la rifampicina nei pazienti HIV-positivi in trattamento con inibitori delle proteasi. Un efficace regime terapeutico alternativo include rifampicina, etambutolo e claritromicina.

I fallimenti terapeutici sono quasi sempre associati a resistenza alla rifampicina.

L'esecuzione di routine del test di sensibilità non è necessaria per *Mycobacterium kansasii*, tutta-

via il saggio relativo alla rifampicina può essere eseguito, soprattutto se l'esame colturale rimane positivo dopo tre mesi di terapia (8, 16). Gli isolati sensibili alla rifampicina lo sono anche alla rifabutina.

17.7.4.3. MYCOBACTERIUM MARINUM

L'esecuzione del test di sensibilità può essere presa in considerazione solo per pazienti le cui colture rimangano positive dopo diversi mesi di terapia. I farmaci da testare includono: amikacina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina, etambutolo, moxifloxacina, rifampicina e trimetoprim/sulfametossazolo (8).

17.7.4.4. MICOBATTERI A CRESCITA RAPIDA

Il test di sensibilità deve sempre essere eseguito sul primo isolato di micobatteri a crescita rapida sviluppatasi da sangue, biopsie, cute e tessuti molli; per gli isolati di origine respiratoria l'esecuzione è subordinata all'accertamento della significatività clinica. I farmaci da testare includono: trimetoprim/sulfametossazolo, ciprofloxacina, moxifloxacina, cefoxitina, amikacina, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolid e tobramicina. Fra questi, l'imipenem non deve essere saggiato (né impiegato) per i ceppi di *Mycobacterium chelonae* e di *Mycobacterium abscessus*. La tobramicina deve essere testata solo sui ceppi di *Mycobacterium chelonae* e, quando risulta attiva, deve essere considerato l'aminoglicoside di scelta per la terapia delle infezioni imputabili a tale specie (19). Il risultato della sensibilità alla ciprofloxacina è valido per i chinoloni di vecchia generazione ma non per quelli più recenti, che sono normalmente assai più efficaci (8).

17.7.4.5. CONCLUSIONI

In conseguenza di quanto sopra, il clinico non può avvalersi, nella grande maggioranza dei casi, dell'ausilio del test di sensibilità; per la terapia dovrà quindi fare riferimento ai dati della letteratura, tenendo ben presente che il trattamento delle patologie da micobatteri a crescita rapida è totalmente differente da quello delle forme imputabili a micobatteri a crescita lenta, e che pirazinamide e isoniazide non sono mai attive sui micobatteri non tubercolari, con la sola eccezione di *Mycobacterium kansasii*, che è sensibile all'isoniazide. In tabella 4 sono riportati i trattamenti farmacologici più indicati per il trattamento delle micobatteriosi dovute alle specie più comuni.

Tab. 4 - FARMACI CONSIGLIATI PER IL TRATTAMENTO DELLE PRINCIPALI INFEZIONI POLMONARI DA MICOBATTERI NON TUBERCOLARI.

Specie micobatterica	Trattamento (durata)	Prognosi
<i>Mycobacterium avium</i> complex	Claritromicina, etambutolo, rifampicina (18 mesi)	Discreta
<i>Mycobacterium kansasii</i>	Rifampicina, isoniazide, etambutolo (18 mesi)	Buona
<i>Mycobacterium malmoense</i>	Rifampicina, etambutolo (24 mesi)	Discreta
<i>Mycobacterium xenopi</i>	Claritromicina, etambutolo, rifampicina, streptomina (18 mesi)	Scarsa
<i>Mycobacterium szulgai</i>	Rifampicina, isoniazide, etambutolo, streptomina (18 mesi)	Buona
<i>Mycobacterium simiae</i>	Claritromicina, moxifloxacina, cotrimossazolo (18 mesi)	Scarsa
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Claritromicina, amikacina, cefoxitina (1 mese)	Scarsa

17.8. DIAGNOSI IMMUNOLOGICA DI INFEZIONE TUBERCOLARE

17.8.1. LA DIAGNOSI IMMUNOLOGICA

La diagnosi immunologica di tubercolosi si basa sull'analisi della risposta del sistema immunitario alla stimolazione con antigeni del bacillo tubercolare.

Gli antigeni utilizzati nel test cutaneo (intradermoreazione di Mantoux o TST, *Tuberculosis Skin Test*) si trovano all'interno di un estratto proteico purificato (PPD) derivato da colture di *Mycobacterium tuberculosis* e la risposta immunitaria si manifesta, sotto forma di ipersensibilità di tipo ritardato, con la comparsa di arrossamento e indurimento in sede di inoculo. In base alle dimensioni dell'indurimento, misurato dopo 48-72 ore, e all'inquadramento in determinate categorie di rischio, il test può essere interpretato come positivo o negativo (tab. 5).

Recentemente sono stati messi a punto sistemi alternativi denominati IGRA (*Interferon-Gamma Release Assay*), basati sul principio che i linfociti T di individui sensibilizzati con determinati antigeni producono interferone- γ (IFN- γ) ogniqualvolta vengano nuovamente in contatto con questi. La produzione di IFN- γ , in seguito alla stimolazione *in vitro* dei linfociti T del paziente con antigeni specifici del bacillo tubercolare, è pertanto indicativa di infezione tubercolare.

I due sistemi, Mantoux e IGRA, ancorché utilizzino approcci diversi, indagano lo stesso fenomeno e forniscono lo stesso tipo di informazione: la negatività è correlata ad assenza di contatto col bacillo tubercolare, la positività presuppone che tale contatto ci sia stato; non permettono tuttavia nessuna speculazione sul tempo intercorso dall'infezione (recente o remota) e sullo stato clinico del paziente (infezione latente o malattia tubercolare).

La principale difficoltà nella determinazione della sensibilità degli IGRA è legata all'assenza di un *gold standard* rispetto al quale effettuare il confronto. I dati presenti in letteratura, necessariamente suddivisi per tipologia di popolazione studiata (immunocompetenti, immunodepressi, bambini, operatori sanitari, vaccinati, non vaccinati), hanno evidenziato una sensibilità (67-87%) non ottimale nell'identificare l'infezione tubercolare latente, con conclusioni talora discordanti. Secondo alcuni Autori gli IGRA hanno una sensibilità maggiore rispetto al test Mantoux; secondo altri le performance di IGRA e TST sono sovrapponibili, altri ancora riportano una sensibilità degli IGRA inferiore a quella della Mantoux. Solo per i soggetti immunodepressi i dati di sensibilità degli IGRA risultano oggettivamente superiori a quelli del test Mantoux. Per quanto riguarda la specificità, i risultati hanno dimostrato valori più elevati degli IGRA (98-99,4%) rispetto al test Mantoux (88,7%). Il valore predittivo sia positivo che negativo degli IGRA, per quanto riguarda la progressione verso la malattia attiva, viene riportato più elevato rispetto al TST (11, 12, 17).

Le principali differenze tra Mantoux e IGRA riguardano:

- il formato del test:
 - la Mantoux si esegue *in vivo*;
 - gli IGRA si eseguono *in vitro*;
- la lettura del test:
 - la lettura della Mantoux è più difficile da standardizzare e richiede il ritorno del paziente a distanza di due o tre giorni dall'inoculo;
 - la lettura degli IGRA è strumentale;
- gli antigeni impiegati:

Tab. 5 - CRITERI DI POSITIVITÀ DELL'INTRADERMOREAZIONE SECONDO MANTOUX, PER GRUPPI DI RISCHIO.

Diametro dell'indurimento		
≥5 mm	≥10 mm	≥15 mm
<p>Soggetti HIV-positivi</p> <p>Contatti recenti di pazienti con tubercolosi</p> <p>Soggetti con lesioni fibrotiche compatibili con progressa tubercolosi al quadro radiologico</p> <p>Pazienti con trapianto d'organo; pazienti in trattamento immunosoppressivo (per esempio, a cui è somministrato l'equivalente di ≥15 mg/die di prednisone per 1 mese o più)</p>	<p>Persone di recente immigrazione (es. entro i 5 anni) da Paesi ad alta endemia tubercolare</p> <p>Tossicodipendenti (uso di droghe per via parenterale)</p> <p>Residenti e personale delle seguenti comunità ad alto rischio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - luoghi di detenzione e carceri - strutture per lungodegenti per anziani - ospedali e altre strutture sanitarie - strutture residenziali per pazienti affetti da AIDS - ricoveri per <i>homeless</i> <p>Personale dei laboratori di micobatteriologia</p> <p>Soggetti con condizioni cliniche ad alto rischio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - silicosi - diabete mellito - insufficienza renale cronica - patologie ematologiche (es. leucemie e linfomi) - neoplasie maligne specifiche (es. carcinoma della testa, del collo o del polmone) - perdita di peso del 10% del peso corporeo ideale - gastrectomia - bypass digiuno-ileale <p>Bambini di età inferiore a 5 anni</p> <p>Neonati, bambini e adolescenti esposti ad adulti ad alto rischio di sviluppo di tubercolosi attiva</p>	<p>Soggetti senza alcun fattore di rischio conosciuto</p>

- per la Mantoux si usa una miscela non ben definita di antigeni tubercolari, alcuni dei quali presenti anche nel ceppo vaccinale BCG e nei micobatteri non tubercolari;
- per gli IGRA si impiegano antigeni ben definiti non presenti nel ceppo vaccinale BCG né nella stragrande maggioranza dei micobatteri non tubercolari;
- la specificità del test:
 - la Mantoux può risultare falsamente positiva nei soggetti vaccinati e in quelli con infezioni da micobatteri non tubercolari;
 - gli IGRA non sono soggetti a tali reazioni crociate, se non in casi rarissimi;
- l'effetto *booster*:
 - la Mantoux, se eseguita più volte, può agire come una microvaccinazione e dare risultati falsamente positivi;
 - gli IGRA, essendo test *in vitro*, non inducono sensibilizzazione;
- il controllo della funzionalità del sistema immunitario:
 - nella Mantoux non esiste un controllo positivo; nei pazienti anergici un risultato negativo può essere un falso negativo;

- negli IGRA la presenza di un mitogeno permette di valutare la capacità di risposta del sistema immunitario; in assenza di tale risposta un risultato negativo viene considerato “indeterminato”;
- costo:
 - minimo per la Mantoux;
 - elevato per gli IGRA.

I due test IGRA attualmente in commercio, QuantiFERON-TB Gold in Tube e T-SPOT.TB, differiscono essenzialmente per la modalità di prelievo, per la metodica di rilevamento dell'IFN- γ , per la complessità di esecuzione e, in particolare nei pazienti con deficit immunitari, per la sensibilità (23).

Per entrambi i sistemi commerciali, che pure sono quantitativi, viene suggerito di refertare il test in maniera qualitativa. L'utilità dell'inserimento nel referto del risultato quantitativo (rispettivamente in Unità Internazionali di IFN- γ o come numero di linfociti T reattivi) è fonte di dibattito tra gli esperti. In test seriali il dato quantitativo permette di valutare la variabilità individuale della risposta immunitaria; non è invece chiaro se un aumento progressivo del valore numerico possa essere interpretabile come indice di progressione verso malattia. Secondo alcuni Autori (26), il dato quantitativo potrebbe fornire al clinico un ulteriore parametro, durante il follow-up, per la valutazione della risposta alla terapia, tuttavia non vi sono dati definitivi che supportino questa ipotesi. La decisione di riportare o meno il valore quantitativo dovrebbe essere presa di comune accordo da microbiologo e clinico.

Un risultato “indeterminato” in un paziente non noto per essere immunodepresso dovrebbe indurre il clinico a ripetere il test su un nuovo prelievo e, in caso di conferma del dato, a prendere in esame l'ipotesi di un deficit immunitario.

Qualunque sia il sistema adottato, è di fondamentale importanza che il sangue prelevato venga miscelato accuratamente con l'anticoagulante, conservato a temperatura ambiente e inviato rapidamente in laboratorio (il tipo di provette e i tempi massimi di conservazione variano a seconda del metodo utilizzato).

I punti ancora da chiarire e attualmente oggetto di studio sono principalmente i seguenti:

- la validità degli IGRA nei soggetti con immunodepressione grave e in età pediatrica;
- il tempo medio necessario per la positivizzazione del test dal momento dell'esposizione all'agente infettante; al momento attuale, nei contatti di soggetti affetti da tubercolosi bacillifera è raccomandata la verifica di un test IGRA risultato negativo ripetendolo dopo 8-10 settimane dal momento dell'esposizione;
- la capacità di predire l'eventuale passaggio da infezione tubercolare latente a malattia;
- le variazioni nel tempo della produzione di IFN- γ , in particolare durante la terapia della malattia tubercolare e nell'infezione tubercolare latente, sia trattata che non trattata.

È doveroso ricordare che, analogamente a quanto noto per la Mantoux, un risultato negativo degli IGRA non permette di escludere la presenza di infezione tubercolare latente e non deve mai essere utilizzato da solo per escludere la malattia in soggetti con sintomi o segni compatibili con tubercolosi attiva (possibilità di falsi negativi).

Indicazioni sull'utilizzo più appropriato degli IGRA sono disponibili, oltre che in varie linee guida internazionali (peraltro non in accordo fra loro) (23, 25), nelle recenti raccomandazioni congiunte AIPO-SIMeR (3).

17.9. SIEROLOGIA

Recentemente l'OMS ha escluso che la ricerca di anticorpi possa essere di una qualche utilità nella diagnosi della tubercolosi e nel follow-up terapeutico.

17.10. IL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA

Analogamente a quanto raccomandato in tutti i Paesi industrializzati, anche in Italia è prevista l'articolazione dei laboratori di micobatteriologia in tre livelli. La distinzione si basa fondamentalmente sul carico di lavoro, dato che, quando il numero degli esami effettuati è esiguo, il mantenimento del necessario livello di competenza diventa impossibile.

Prendendo in esame la sola attività diagnostica, i compiti dei laboratori dei vari livelli risultano così ripartiti:

- i laboratori di primo livello dovrebbero eseguire soltanto l'esame microscopico, inviando a un laboratorio di livello superiore i campioni per la coltura;
- i laboratori di secondo livello dovrebbero eseguire anche l'esame colturale, differenziare i micobatteri non tubercolari da quelli appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex e saggiare la sensibilità di questi ultimi ai farmaci di prima linea ed eventualmente implementare i test di amplificazione genica per *Mycobacterium tuberculosis* complex direttamente da campione clinico;
- i laboratori di terzo livello dovrebbero, in aggiunta ai compiti previsti per i livelli inferiori, identificare tutti i micobatteri a livello di specie e, quando necessario, eseguire l'antibiogramma con i farmaci antitubercolari di seconda scelta e saggiare la sensibilità dei micobatteri non tubercolari.

Pur non essendo stato specificato quali siano i laboratori a cui compete l'esecuzione dei test IGRA, pare scontato che tali attività debbano essere riservate ai laboratori di livello non inferiore al secondo.

In molti laboratori è diffusa la tendenza ad eseguire test anche al di fuori della propria competenza; tale tendenza, che si concretizza in un notevole aumento dei costi accompagnato da un netto abbassamento del livello qualitativo, deve essere scoraggiata.

Fra i requisiti qualitativi più importanti di un laboratorio di micobatteriologia è la capacità di rientrare nei tempi di refertazione suggeriti dai CDC di Atlanta (6) e riportati in tabella 3.

BIBLIOGRAFIA

1. ATS, CDC, IDSA, *Treatment of tuberculosis*, 2003, MMWR; 52:1-77.
2. Apers L., Mutsvangwa J., Magwenzi J., Chigara N., Butterworth A., Mason P., Van Der S.P., *A comparison of direct microscopy, the concentration method and the Mycobacteria Growth Indicator Tube for the examination of sputum for acid-fast bacilli*, 2003, Int J Tuberc Lung Dis; 7:376-381.
3. Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO), Società Italiana di Medicina Respiratoria (SIMeR), *Documento sull'utilizzo dei nuovi test immunologici per la diagnosi di infezione tubercolare latente*, 2007, Rass Patol App Respir; 22:13-20.
4. CDC, *Nucleic acid amplification tests for tuberculosis*, 1996, MMWR; 45:950-952.
5. CDC, *Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis*, 2000, MMWR; 49:593-594.
6. CDC, *Controlling tuberculosis in the United States: recommendations from the American Thoracic Society, CDC, and the Infectious Diseases Society of America*, 2005, MMWR; 54:1-81.
7. CDC, *Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis*, 2009, MMWR; 58:7-10.
8. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes; approved standard*, 2011, 2nd edition, CLSI, Wayne, Pa; M24-A2.
9. Daniel T.M., *The rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review*, 1990, J Lab Clin Med; 116:277-282.
10. Della-Latta P., *Digestion-decontamination procedures*, in: Isenberg H.D Ed., *Clinical microbiology procedures handbook*, 2004, ASM Press, Washington, DC; 7.1.2.1-7.1.2.9.
11. Diel R., Goletti D., Ferrara G., Bothamley G., Cirillo D., Kampmann B., Lange C., Losi M., Markova R., Migliori G.B., Nienhaus A., Ruhwald M., Wagner D., Zellweger J.P., Huitric E., Sandgren A., Manissero D., *Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis*, 2011, Eur Respir J; 37:88-99.
12. Diel R., Loddenkemper R., Nienhaus A., *Predictive value of interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for predicting progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis*, 2012, Chest; 142:63-75.
13. Fattorini L., Migliori G.B., Cassone A., Mustazzolu A., Piccaro G., Filippini P., Cirillo D.M., Borroni E., *Italian Multicentre Study on Resistance to Antituberculosis Drugs Group, Proficiency testing of first- and second-line anti-tuberculosis drugs in Italy*, 2012, Eur Respir J; 39:1263-1266.
14. Gordin F.M., Horsburgh C.R. Jr., *Mycobacterium avium complex*, in: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Ed. 2897-909, *Principles and practice of infectious diseases*, 2005, Elsevier Churchill Livingstone Press, New York.
15. Greco S., Girardi E., Navarra A., Saltini C., *The current evidence on diagnostic accuracy of commercial based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis*, 2006, Thorax; 61:783-790.
16. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B.A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F. Holland S.M., Horsburg R., Huitt G., Iademarco M.F., Iseman M., Olivier K., Rouss S., von Reyn C.F., Wallace R.J. Jr., Winthrop K., ATS

- Mycobacterial Disease Subcommittee, American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America, *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases*, 2007, *Am J Respir Crit Care Med*; 165:367-416.
17. Herrera V., Perry S., Parsonnet J., Banaei N., *Clinical application and limitations of Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection*, 2011, *Clin Infect Dis*; 52:1031-1037.
 18. Jasmer R.M., Roemer M., Hamilton J., Bunter J., Braden C.R., Shinnick T.M., Desmond E.P., *A prospective, multicenter study of laboratory cross-contamination of Mycobacterium tuberculosis cultures*, 2002, *Emerg Infect Dis*; 8:1260-1263.
 19. Jensen P.A., Lambert L.A., Iademarco M.F., Ridzon R., *Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in health-care settings*, 2005, 2005, *MMWR Recomm Rep*; 54:1-141.
 20. Kent P.T., Kubica G.P., *Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory*, 1985, US Department of Health and Human Services, Atlanta, DC.
 21. Ling D.I., Flores L.L., Riley L.W., Pai M., *Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression*, 2008, *PLoS ONE*; 3:e1536.
 22. Mazurek G.H., Jereb J., Lobue P., Goldberg S., Castro K., *Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection, United States*, 2010, *MMWR Recomm Rep*; 59:1-25.
 23. Menzies D., Pai M., Comstock G., *Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research*, 2007, *Ann Intern Med*; 146:340-354.
 24. Moore D.F., Curry J.I., Knott C.A., Jonas V., *Amplification of rRNA for assessment of treatment response of pulmonary tuberculosis patients during antimicrobial therapy*, 1996, *J Clin Microbiol*; 34:1745-1749.
 25. NICE, *Clinical guideline 117 Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*, 2011.
 26. Pai M., Kalantri S., Dheda K., *New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis*, 2006, *Expert Rev Mol Diagn*; 6:413-422.
 27. Pfyffer G.E., *Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures*, in: Murray P.R., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover F.C., Eds., *Manual of clinical microbiology*. 9th Ed., 2007, ASM press, Washington DC.
 28. Piersimoni C., Scarparo C., *Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples*, 2003, *J Clin Microbiol*; 41:5355-5365.
 29. Shafran S.D., Talbot J.A., Chomyc S., Davison E., Singer J., Phillips P., Salit I., Walmsley S.L., Fong I.W., Gill M.J., *Does in vitro susceptibility to rifabutin and ethambutol predict the response to treatment of Mycobacterium avium complex bacteremia with rifabutin, ethambutol, and clarithromycin?*, 1998, *Clin Infect Dis*; 27:1401-1405.
 30. WHO, *Treatment of tuberculosis: Guidelines*, 2009, 4th Ed., WHO Geneva, Switzerland.

ATLANTE FOTOGRAFICO



Fig. 1.9 - AMEDEO MODIGLIANI. MADAME G. VAN MUYDEN.



Fig. 1.10 - MARIE DUPLESSIS RITRATTA DA EDUARD VIENOT.



Fig. 1.18 - EDVARD MUNCH. IL SOLE, 1909.

Fig. 3.1 - GRANULOMA TUBERCOLARE.
COLORAZIONE EMATOSSILINA-EOSINA.

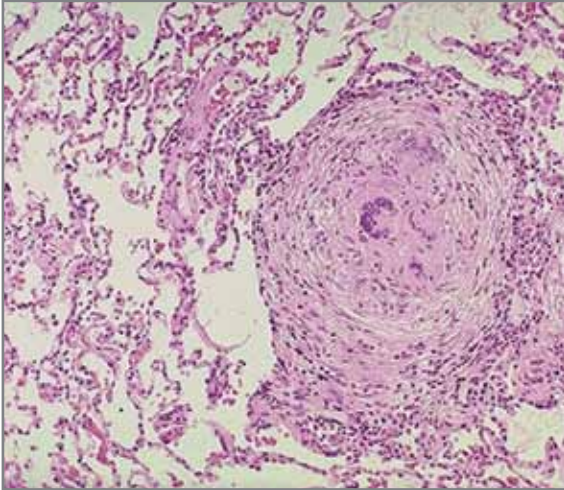


Fig. 3.2 - SEZIONE DEL POLMONE CON CAVERNE
TUBERCOLARI.



Fig. 4.4 - LESIONE DA
MYCOBACTERIUM ULGERANS.



Fig. 4.3 - LESIONE
DA MYCOBACTERIUM
MARINUM.



Fig. 4.5 - LESIONI
DA MYCOBACTERIUM
ABSCUSSUS.

Fig. 6.1. - COLORAZIONE DI ZIEHL-NEESEN.

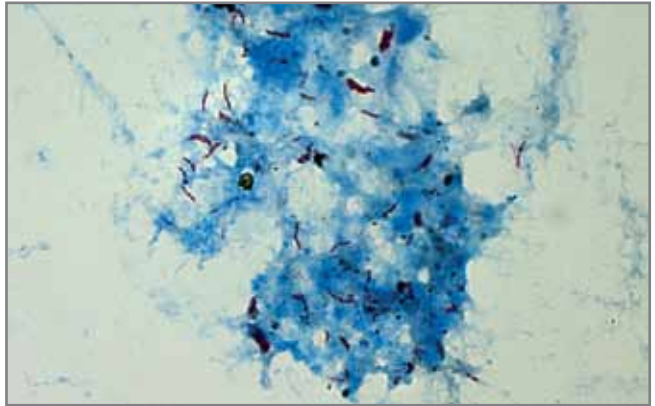


Fig. 6.2. - COLORAZIONE CON AURAMINA.

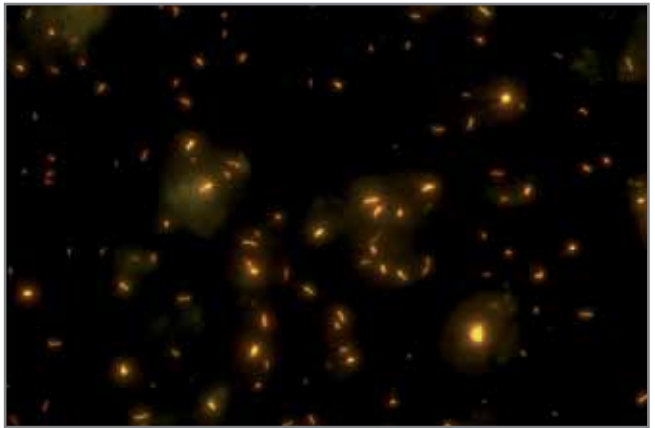
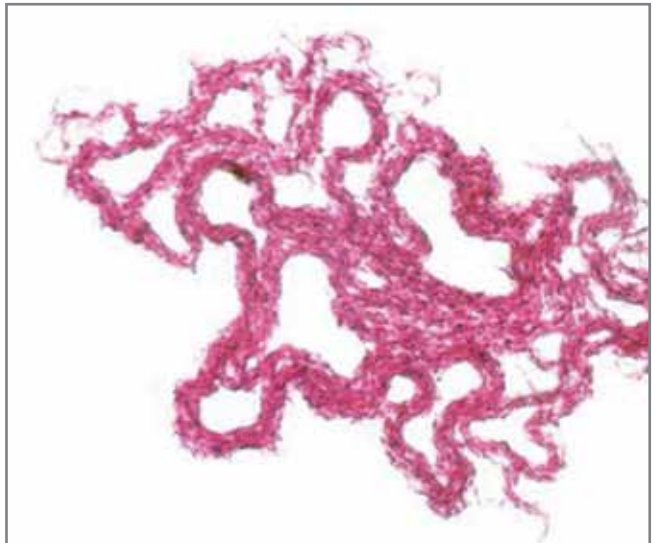
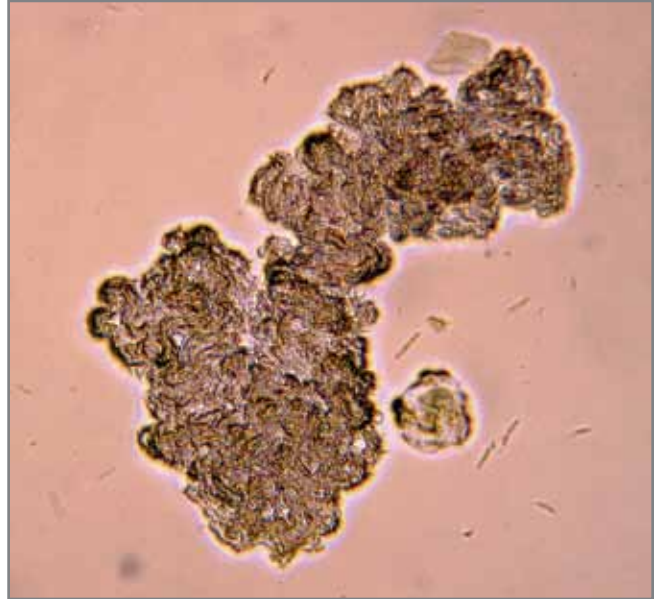


Fig. 6.7. - FASCI DI MICOBATTERI SVILUPPATISI IN TERRENO LIQUIDO COLORATI CON ZIEHL-NEESEN.



**Fig. 7.2 - MICROCOLONIE DI
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SU
TERRENO AGARIZZATO OSSERVATO
A 10x.**



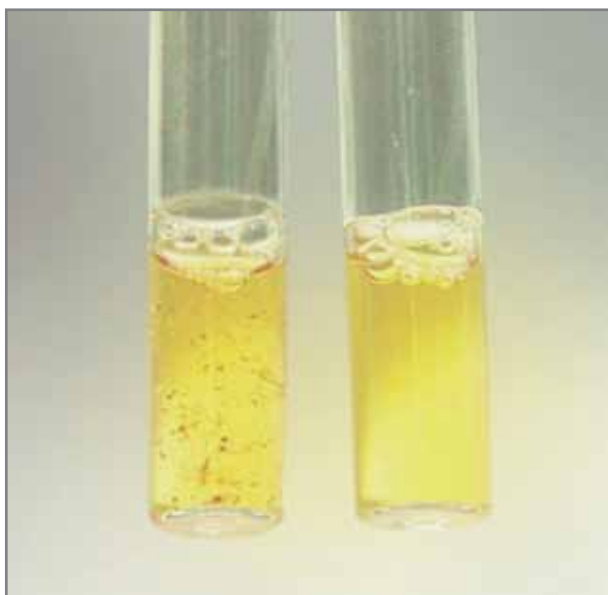
**Fig. 7.3 - COLTURE DI
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
SU TERRENO ALL'UOVO.**

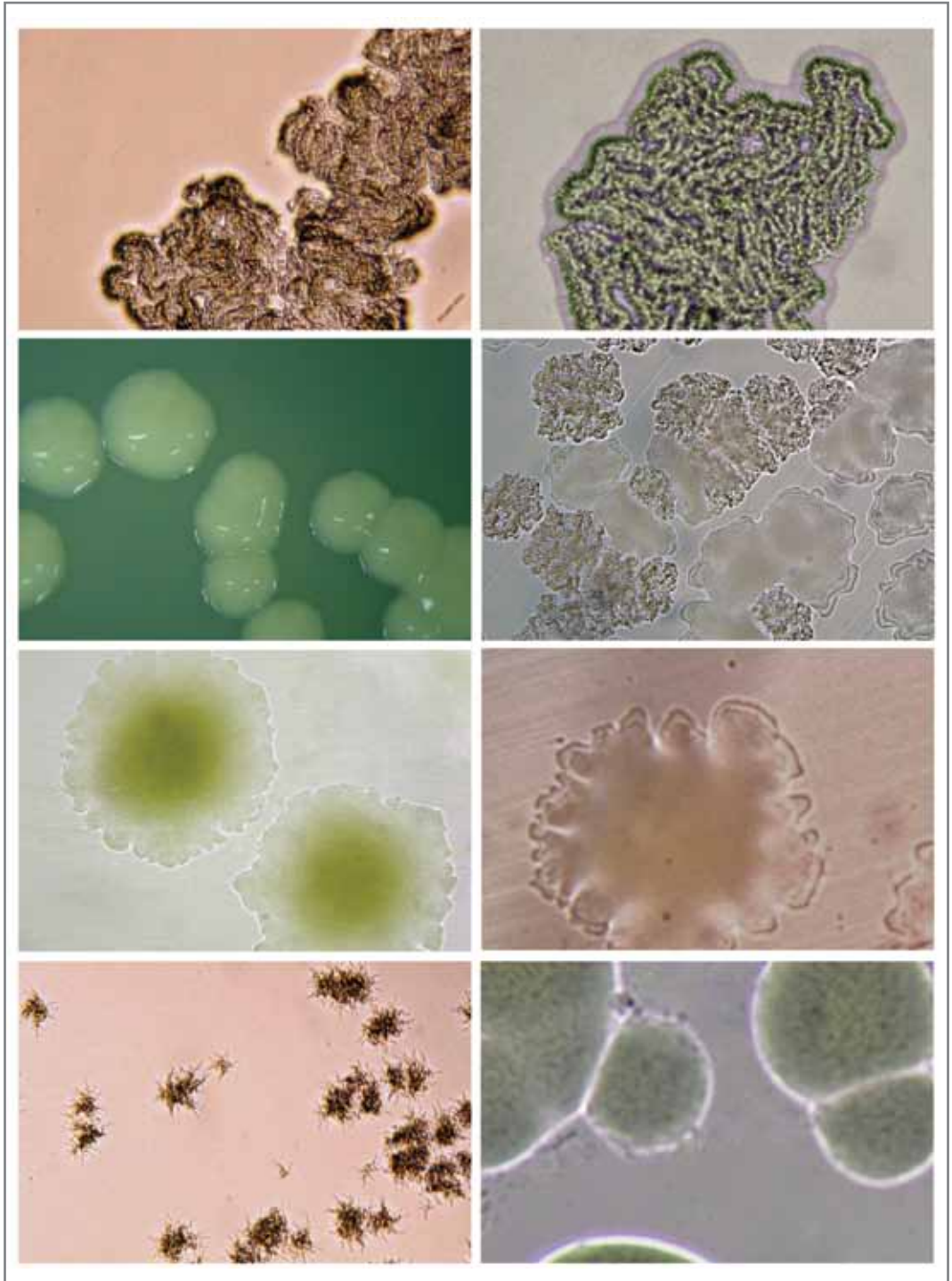




**Fig. 7.4 - Tubi MGIT
NEGATIVO E POSITIVO.**

**Fig. 7.5 - MICROCOLONIE IN TERRENO
MB REDOX (A SINISTRA).**





Nella pagina a fianco Fig. 8.1 - MICROCOLONIE DI MICOBATTERI OSSERVATE AL MICROSCOPIO (10x).

DA SINISTRA VERSO DESTRA E DALL'ALTO VERSO IL BASSO:

M. TUBERCULOSIS; *M. TUBERCULOSIS* (CRESCITA IN TERRENO MGIT);

"*M. CANETTII*"; *M. AVIUM* (COLTURA COMPRENDENTE COLONIE LISCE E RUGOSE);

M. SIMIAE; *M. INTERJECTUM*; *M. XENOPI*; *M. MYCOBACTERIUM SPP.* (COLONIE LISCE).

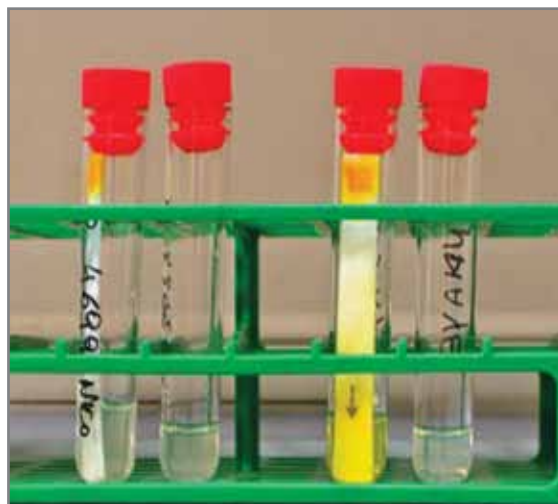


Fig. 8.2 - LETTURA DEL TEST DELLA NIACINA;
DA SINISTRA:
PROVETTA NEGATIVA CON RELATIVO "BIANCO",
PROVETTA POSITIVA CON RELATIVO "BIANCO".



Fig. 8.3 - LETTURA DEL TEST DEI NITRATI;
TEST POSITIVO E NEGATIVO.

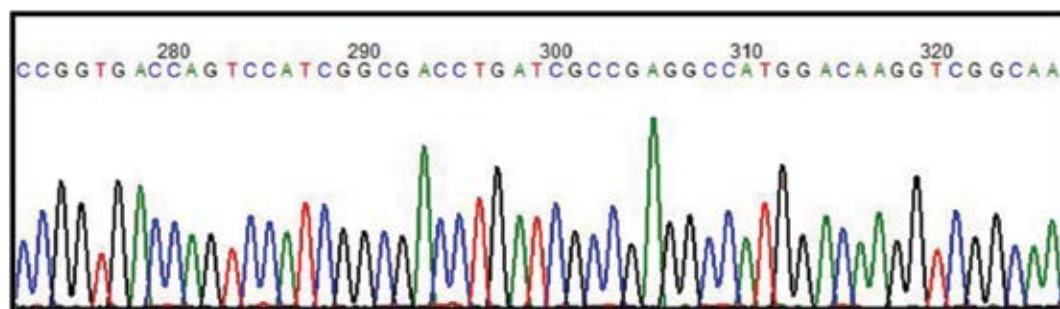


Fig. 8.14 - ELETTROFEROGRAMMA.

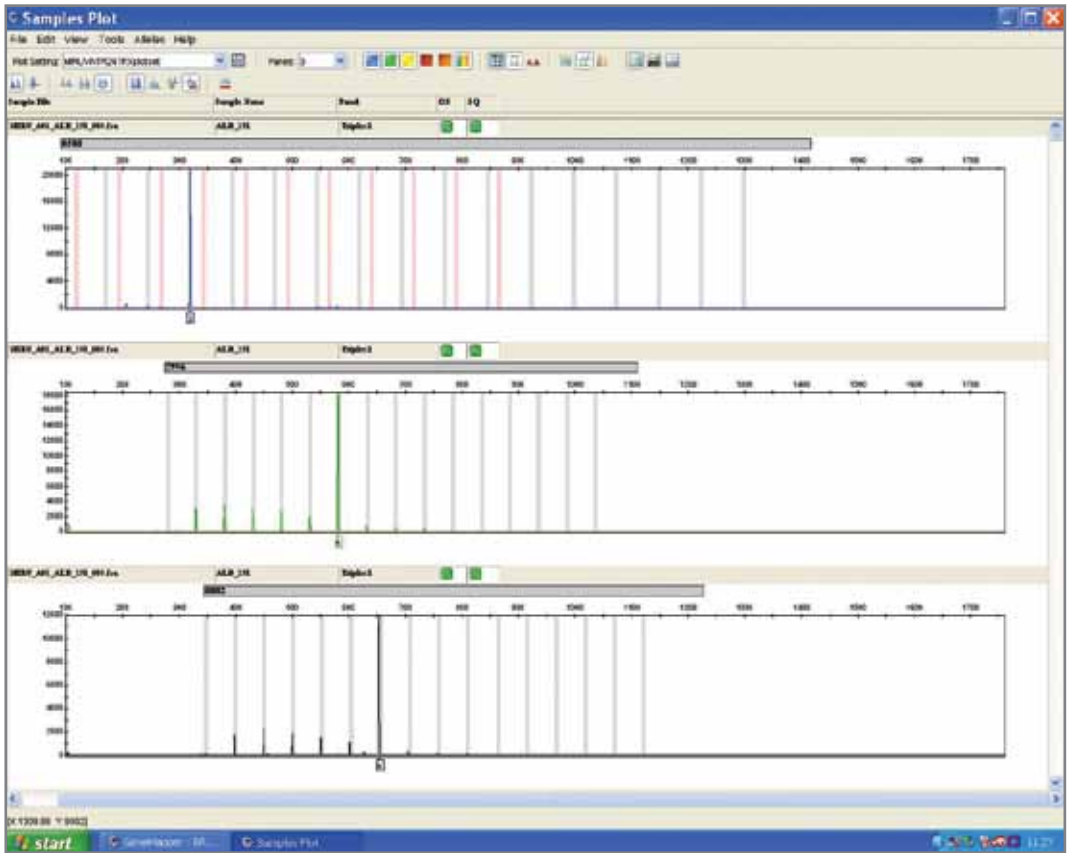


Fig. 12.4 - ANALISI AUTOMATICA DI SEQUENZE DI LOCI MIRU (SOFTWARE GENMAPPER).

INDICE ANALITICO

A

- 5'nucleasi 266
- 7H10, Middlebrook 161, 163, 164, 190, 215-221, 223, 376, 377
- 7H11, Middlebrook 161, 163, 164, 190, 215, 216, 223
- 7H12, Middlebrook 167
- 7H9, Middlebrook 155, 163, 165, 167, 169, 170, 172, 175, 176, 216, 218, 219, 226, 376, 377
- 7-metilguanosina metiltransferasi 246
- A.L.L. Digestion Neutralisation 161
- Aalto, Aino 37
- Aalto, Alvar 37
- ABI PRISM, Applied Biosystems, strumentazione 270
- Abu-Ali Al-Husain Ibn-Sina, detto Avicenna 10
- acalasia 101
- AccuProbe 100, 196, 197
 reazioni crociate 197
- accuratezza diagnostica 248, 276
- acetiltransferasi 246
- acidi grassi, saturi e insaturi, della parete micobatterica 53, 192-194
- acidi micolici 4, 6, 53, 70, 98, 100, 141, 146, 192-195
- acido nalidixico 163, 165, 168, 170-172
- acido oleico 163, 165, 168, 170-172, 177, 216
- acido ossalico 159, 160
- acido palmitico ¹⁴C radiomarcato 167
- acido para-aminosalicilico, vedi pAS
- acido peracetico 350
- acido solforico 24, 159, 160, 375
- acido tuberculostearico 193
- Acquapendente, Girolamo Fabrizio di 13
- acridinio, esteri di 196, 267
- Actinobacteria* 54
- Actinobacteridae* 54
- Actinomyces* 53
- Actinomycetales* 54
- addominali, dolori 75, 108, 110
- adenopatia, vedi linfadenopatia
- aderenza al trattamento antitubercolare (*compliance*) 64, 80, 81, 398, 241
- αDNA 4, 5, 6
- aerosol 89, 93, 129, 130, 341-345, 369, 387
- Africa, tubercolosi in 3-5
- AG N-acetiltransferasi 246
- agarizzati, terreni 24, 162-164, 218-221, 223, 414 (vedi Middlebrook 7H10 e 7H11)
- agenti biologici 339, 340, 341, 344, 357
 classificazione 339
 inalazione 89, 341
 ingestione 28, 341, 369, 371
 inoculazione 22, 24, 89, 341, 342
 misure di contenimento del rischio di infezione 340, 357
 rischio di infezione 29, 109, 312, 313, 324, 326, 339, 341, 344, 358, 345
- agoaspirato 73, 102, 126, 131, 132
- ahpC* 242
- AIDS 66, 89, 104, 107-109, 174, 322, 323, 403
- Albucasis 10
- alcol isopropilico 343, 351
- alcol-acido-resistenza 53, 141, 146, 161, 190, 376, 385
- alcol-acido-resistenti, bacilli 4, 5, 24, 91, 141-144, 146, 148-150, 161, 164, 166, 170, 172, 173, 176, 177, 179, 220, 250, 268, 356, 374, 375, 385, 390, 391
- alcolismo 72, 96, 97, 99, 327
- Ali Abas 10
- Al-Majousi 10
- AMCLI (Associazione Microbiologi Clinici Italiani) 359, 362
- America, tubercolosi in 3-5
- American Society for Microbiology 355
- American Thoracic Society
 criteri diagnostici di micobatteriosi 91, 93, 98, 99, 101, 162, 400
 linee guida terapeutiche per le micobatteriosi 93, 94
- American Thoracic Society *medium* 162
- amfotericina B 163, 165, 166, 168, 170-172
- amikacina 46, 64, 93, 95, 101, 102, 104, 106, 213-215, 223, 227, 228, 231-236, 242, 245-247, 251, 253, 397-399, 401
- aminoglicosidi 109, 175, 245-247, 251
- ammonio quaternario, composti di 351
- amoxicillina/acido clavulanico 233
- AmpErase (uracile-N-glicosilasi) 271
- ampliconi 197, 200, 201, 263-267, 271, 276, 304
- AMPLICOR 100, 271
- amplificazione 100, 131, 149, 161, 197, 200, 201, 203-205, 242, 248, 249, 263-280, 292, 298-300, 302-305, 309, 311, 356, 363, 377-380, 391, 394-397, 405
 generalità 263-267, 394-397
 interpretazione 279, 396, 397
 problematiche 278, 279, 396, 397
 refertazione 279

- test commerciali 267-275
 utilità clinica 276, 277
 Xpert MTB/RIF 242, 248, 253, 272-274
- Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test*, vedi MTD2
- AMPLILINK 271
- AMV transcriptasi inversa 264
- Amycolatopsis rifamycinica* 46
- ancient DNA 4-6
- aneurisma di Rasmussen 70, 71
- Anglicus, Gilbertus 11
- anidride carbonica ¹⁴C radiomarcata 167
- Anna, regina 12
- antibiogramma colturale 80, 104, 167, 213-215, 222, 223, 226, 227, 229, 230, 231, 233, 235, 241, 247, 252, 254, 263, 311, 358, 359, 363, 398-400, 405
 diretto su terreno solido per MTC 220, 221
 farmaci antitubercolari 214, 215
 generalità 213
 per farmaci di seconda scelta per MTC 223-226, 398
 per MAC 229, 230, 400
 per MNT 227-236, 400, 401
 per MNT a lenta crescita 227-232, 400, 401
 per MNT a lenta crescita diversi da MAC, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii* 231, 232
 per MNT a rapida crescita 232-236, 401
 per *Mycobacterium kansasii* 230, 231, 400
 per *Mycobacterium marinum* 231, 401
 per *Mycobacterium tuberculosis* complex 213, 214, 397, 398
 su terreno liquido con metodo automatico VersaTREK 222, 223
 su terreno liquido MGIT (metodo automatico) 221, 222
 su terreno liquido MGIT (metodo manuale) 221
 su terreno solido a base di uovo 216-218
 su terreno solido agarizzato 218-220
 su terreno solido 216-221
- antibiogramma molecolare
 interpretazione 253, 254
 marker di resistenza 399
 meccanismi di resistenza 241, 242
 metodiche di rilevamento del profilo di resistenza di *Mycobacterium tuberculosis* 248-253
 resistenze a etambutolo, pirazinamide 244, 245
 resistenze a fluorochinoloni 246
 resistenze a rifampicina, isoniazide, etionamide 242, 243
 resistenze ad aminoglicosidi e peptidi ciclici 245, 246
 resistenze crociate 247
- anticoagulante 130, 161, 175, 176, 404
- anticorpale, risposta immunitaria 405
- antigeni peptidici utilizzati per IGRA 323, 328
- antiretrovirale, terapia 66, 104, 107, 109, vedi anche inibitori delle proteasi
- anti-TNF- α , terapia 109, 325
- antitubercolari, farmaci, vedi farmaci
- aperta, tubercolosi, vedi tubercolosi aperta
- apicali, focolai tubercolari polmonari 32, 68, 69, 72, 99
- apicolisi extrafasciale 33
- appropriatezza diagnostica 125, 279, 361
- araba, tubercolosi nell'antica cultura 9, 10
- arancio di acridina 144
- Areico 9
- Areteo di Cappadocia 9, 17
- aria, ricambi di, in laboratorio di micobatteriologia 345, 346
- Aristotele 9, 13
- Arnaldo da Villanova 11
- arricchimento OADC, vedi OADC
- articolari, lesioni, vedi lesioni osteo-articolari
- artrite 107
- ascite 75
- ascitico, liquido 126, 130
- Ascoli, Maurizio 31
- Asia, tubercolosi in 3, 5, 6
- aspirato
 bronchiale 91, 93, 96, 128-130, 155, 387, 388, 400
 gastrico 128-130, 155, 273, 387, 388
 midollare 108, 387
 trans-tracheale 128, 129, 388
- assicurazione antitubercolare 36
- Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) 359, 362
- associazione, terapia di 33, 45, 79, 92, 93, 96, 97, 99, 102, 104, 105, 242, 246
- ATCC 12478, *Mycobacterium kansasii* 164, 166, 173, 230
- ATCC 13950, *Mycobacterium intracellulare* 177
- ATCC 25177, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra 164, 268-272, 275
- ATCC 25922, *Escherichia coli* 164
- ATCC 27294, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 166, 173, 177, 226, 268-272, 275
- ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 236
- ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* 230, 236
- ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* 236
- ATCC 6841, *Mycobacterium fortuitum* 164, 166, 173

- ATCC 700898, *Mycobacterium avium* complex 230
 ATCC 927, *Mycobacterium marinum* 230
 atelettasia 68, 72, 73, 125
 atipici, micobatteri 53, vedi MNT
 ATS medium (American Thoracic Society medium), terreno 162
 ATS, vedi American Thoracic Society
 Auenbrugger, Leopold Joseph 20
 auramina e sue varianti 141, 142, 144-146, 150, 391, 413
 autoclave per sterilizzazione 343, 345, 349
 automazione in micobatteriologia 145, 395
 Avicenna 10
 Avicenna, canone di 10
 azitromicina 93, 106, 229
 azlocillina 165, 168, 170-172
- B**
- BAAR, vedi alcol-acido-resistenti, bacilli
 bacilli alcol-acido-resistenti, vedi alcol-acido-resistenti, bacilli
 bacillifera, tubercolosi, vedi tubercolosi aperta
 bacillo Calmette-Guérin 34, vedi anche BCG
Bacillus leprae 53
Bacillus tuberculosis 53
 BacT/ALERT 3D 169, 176, 177
 BacT/ALERT MB 132, 175, 177
 BacT/ALERT MP 170, 175
 BACTEC 12B 167
 BACTEC 460TB 166, 168
 BACTEC 9000 MB 172, 173, 175
 BACTEC MGIT 960 167, 168
 BACTEC MicroMGIT Fluorescence Reader 165, 169
 BACTEC Myco/F Lytic 132, 175
Bacteria, regno 53, 54
 Baer 32
 Baglivi, Giorgio 30
 Baillie, Matthew 15
 BAL, vedi lavaggio bronco-alveolare
 Bang, Bernhardt 28
 Bard, Louis 30
 Barellai, Giuseppe 36
 Bassi, Agostino 22
 batteriemia 75, 229, 370, 390, 400
- Bayle, Gaspard Laurent 15, 21
 BBL MycoPrep 160
 BCG, vedi *Mycobacterium bovis* BCG
 BD MGIT *TbC Identification Test* 203
 BD ProbeTec ET *Mycobacterium tuberculosis complex* 268
 Béclère, Antoine 29
 Beijing, famiglia 304, 313
 Bell, Michael 17
 Bernau 32
 Bernhard, Sarah 19
 Bernheim, Fredrick 44
 Bibbia, tubercolosi nella 7
 Bichat, Marie Francois Xavier 21
 biochimico-colturali, test 54, 91, 187, 191, 376, 378, 397
 Bio-dev 148
 Bio-development s.r.l 148
 BioEdit 206
 Biohazard di classe II, cappa di sicurezza 142, 176, 178, 219, 340, 344, 345, 350, 357, 363
 bioinformatica 57
 biologia molecolare 6, 68, 97, 98, 103, 273, 276, 289, 355, 359, 373, 394, 395, 399
 biologica, terapia 109
 biopsia 29, 74, 75, 91, 93, 108, 111, 126, 128-130, 132, 155, 233, 268, 387, 389, 400, 401
 biosicurezza, livello di 226, 291, 340, 344, 357, 358, 363
 Birckersteth, Henry 30
 Bizio, Bartolomeo 43
 BLAST 206, 207
 Bodington, George 36
 Bonn 15
 booster, effetto 322, 326, 403
 borsite 106, 107
 Bourru, Edmond Claud 30
 bovina, tubercolosi 28, 29, 68, 369-379
 anatomia-patologica/istopatologia 369-374
 clinica 369, 370
 decontaminazione dei campioni 375, 376
 epidemiologia 370, 371
 eradicazione 370
 identificazione 376-380
 ospite umano 371
 raccolta e trasporto campioni 373
 storia 28, 29

- tecniche molecolari 377-380
 trasmissione/vie di infezione 369
- Brauer, Ludolf 31, 32
breakpoint 215, 230-232, 234, 235
 Brehmer, Hermann 36
 British Thoracic Society 94
 Brock 32
 bromuro di etidio 266
 bronchiale, aspirato, vedi aspirato
 bronchiectasie 71, 72, 90-92, 95, 96
 bronchite cronica 71, 90
 broncoaspirato, vedi aspirato bronchiale
 broncolitiasi 71
 broncopolmonite 69, 72, 370
 broncoscopia 129-131
 broncoscopio 128, 130, 388
 BstEII, enzima di restrizione 203, 204
 Budd, William 23
 Bugie, Elisabeth 44
bumper 265
 Bunyan, John 25
 Buruli, ulcera del 105
- C**
- cabina di sicurezza biologica 142, 176, 178, 219, 340, 344, 345, 350, 357, 363
 Caio Plinio, detto il Vecchio 9, 38
 calcificazione 68, 72, 370
 Calmette, Leon Charles Albert 34, 35
 calo ponderale 71, 73, 90, 92, 95-101, 125
 calore umido 349
 camice 126, 345
 Camper 15
 campioni clinici
 arricchimento (concentrazione) 155, 156
 coltura, vedi colturale, esame
 conservazione 132, 133
 contaminati dalla flora residente 155
 decontaminazione, vedi decontaminazione
 fluidificazione 155
 idoneità 133, 388, 389
 preparazione 155, 156
 raccolta 126-132, 387, 389
 resa diagnostica ed appropriatezza 125
 smaltimento 343, 345, 349, 350
 sterili, non contaminati dalla flora residente 155
- suggerimenti diagnostici 386-387
 Canone di Avicenna 10
 cappa di sicurezza biologica 142, 176, 178, 219, 340, 344, 345, 350, 357, 363
 capreomicina 64, 213-215, 223, 227, 242, 245, 251, 253, 397-399
 capsule eburnee 11
 carbolfucsina 24, 141-144, 146, 150, 190, 391
 cardiocirurgico, intervento 107
 carico minimo di lavoro 356
 Carlo X, re 12
 Carson, James 30
 caseosa, necrosi 67-70, 370
 caso indice 289, 290, 310-312, 324
 catalasi-perossidasi 242, 243
 catetere, infezioni da 110
 cattura, estrazione per 270, 272, 278
 Cave, AJE 4
 caverna tubercolare, vedi cavitaria, lesione
 cavitari, liquidi 128, 130, 155, 156, 332, 389, 393, vedi anche liquidi
 cavitaria, lesione (caverna) 14, 30, 68-71, 73, 92, 94, 95, 98-100, 125, 129, 131, 370, 412
 cavitazione, vedi cavitaria, lesione
 Cayeley, William 30
 CD4+, linfociti 108, 109, 325, 387
 CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) 214, 276, 279, 324, 346, 356-358, 394, 396, 398, 405
 cefalo-rachidiano, liquido (liquor) 126, 128, 131, 142, 155, 268, 273, 277, 389, 393
 cefepime 233
 cefoxitina 95, 101, 102, 106, 233, 235, 236, 401
 ceftriaxone 233
 Celio Aureliano 9
 cellule epitelioidi 67
 cellule giganti di Langhans 67
 cellule giganti multinucleate 67
 cellulite 104, 106, 107
 celluloso-mediata, risposta immunitaria (ipersensibilità di tipo ritardato) 26, 35, 68, 70, 72-74, 76, 321, 323, 325, 328, 402
 Centers for Diseases Control and Prevention, vedi CDC
 centralizzazione delle procedure diagnostiche 355
 Centri Macroregionali di Riferimento 363

- centrifuga 157, 175, 345, 363, 375
- centrifugazione dei campioni 141, 142, 156-158, 174, 175, 178, 197, 293, 341, 344, 348, 356, 390
- Centro di Riferenza Nazionale per la Tuberculosis da *Mycobacterium bovis*, vedi TBCentro
- Centro di Riferimento 79, 187, 214, 226, 227, 232, 291, 359, 361, 362, 386, 398
- Centro Regionale di Riferimento 361, 362
- ceppotipo tubercolare 313
- cere della parete micobatterica 53, 195
- CFP-10, *Culture Filtrate Protein* 10 323, 324, 328-330, 332
- chemiluminometro 267, 268
- chemioprolifassi, vedi terapia dell'infezione tubercolare latente
- chinoloni, vedi fluorochinoloni
- chirurgica, terapia 12, 32, 33, 38, 73, 94, 95, 97, 99, 101, 102, 104-107
 pneumotorace 30, 31
 storia 32, 33
- Chopin, Fryderyk Franciszek 18
- Chorine, Vital 45
- Churchill, Edward Delos 32
- Cicerone 9
- cinese, tubercolosi nell'antica cultura 6, 7
- ciprofloxacina 97, 98, 100, 101, 105, 106, 213-215, 228, 231-233, 235, 236, 397, 401
- citocentrifugazione 142
- citrato di sodio 130, 156, 161, 165, 295, 389
- citrato ferrico 103, 163, 172, 175
- citrato trisodico 130, 161, 389
- claritromicina 93-96, 98, 100-102, 104-106, 109, 228-233, 235, 236, 400, 401
- Clark, George Sidney Smith 36
- Clark, James 36
- classificazione dei laboratori, vedi laboratorio di micobatteriologia
- classificazione di Runyon 57, 89
- Clinical and Laboratory Standard Institute, vedi CLSI
- Clodoveo di Francia, re 12
- clofazimina 94, 215
- cloroderivati, disinfettanti 351
- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), ex NCCLS 104, 107, 215, 223, 226, 227, 230, 276, 400
- cluster epidemico 289, 296, 310, 312
- COBAS AMPLICOR 271
- COBAS TaqMan 271, 273, 274, vedi anche TaqMan
- codice binario, *Spoligotyping* 307, 308
- Codice di Hammurabi 7
- codice ottale, *Spoligotyping* 307, 308
- Codice, biblioteca di Montecassino 11
- Coletsos, terreno di 162, 376
- colliquazione 13, 68, 69, 73, 102, 370
- colonie
 morfologia 34, 35, 53, 148, 187, 190, 376, 390
 pigmentazione 54, 57, 89, 99, 105, 187, 190, 191
 velocità di crescita 54, 57, 89, 187, 190, 376, 385
- colonizzazione da micobatteri non tubercolari 89, 90, 93, 98, 100, 108
- colorante
 primario 141, 142, 144
 secondario 144
- coloratore automatico 145, 146
- colorazione del vetrino 53, 147, 356, 374, 375, 385, 391, 413
 automazione 145, 146
 generalità 53
 metodi 142-145
 storia 23-26
- colorimetrico, rilevamento 167, 169
- colturale, esame 90, 96, 97, 104, 141, 146, 147, 155, 156, 162, 248, 263, 276, 311, 328, 356, 358, 363, 373, 374, 380, 390-393, 397, 398, 401, 405
 contaminazioni e cross-contaminazioni 177, 178
 controllo di qualità 164, 173, 174
 generalità 155, 162-172, 392-394
 gestione dei terreni solidi 163, 164
 in terreni selettivi 163
 in terreno liquido, generalità 164
 in terreno liquido, sistemi automatici 168-173
 in terreno liquido, sistemi manuali 165, 166
 in terreno solido, a base di agar 163
 in terreno solido, gestione 163, 164
 in terreno solido, all'uovo 162
 per ricerca di tubercolosi bovina 374-376
 refertazione 178
 terreni per emocoltura 174-177
- complesso (complex) 56-58
- complesso primario 68, 69, 370
- complex, vedi complesso
- compliance al trattamento antitubercolare, vedi aderenza
- concentrazione critica di un farmaco 213, 222, 226
- concentrazione minima inibente, vedi MIC

- concentrazione del campione biologico 141, 146, 155, 161, 175
 concentrazioni assolute, metodo delle 214
 concentrazioni di farmaco, antibiogramma per MTC 215
 Condorelli, Luigi 32
 conservanti 127-129, 132, 373, 387, 389
 conservate, regioni del genoma 54-56, 249, 270
 conservazione del campione biologico 125, 127, 129, 131-133, 135, 137, 164, 386, 404
consumption 8
contact tracing 289
 contagio 9, 10, 13-18, 21, 22, 27, 28, 36, 41, 53, 70, 80, 89, 149, 241, 279, 289, 312, 345, 346, 369, 386, 390
 contaminazione crociata di laboratorio 142, 145, 147, 157, 161, 170, 177, 178, 265, 266, 268-271, 276, 278, 289, 307, 309, 311, 393-395
 amplificazione genica 265, 266, 268-271, 276, 278, 395
 colture 177-179
 esame microscopico 142, 145, 147,
 generalità 177, 178, 393, 394
 genotipizzazione, esame 178, 289, 309, 311
 indicatori 178
 misure di prevenzione 178
 contaminazione dei campioni 127, 131, 159-163, 165, 169, 177-179, 217, 219
 contatto di caso di tubercolosi 18, 34, 35, 77, 79, 80, 242, 252, 254, 310, 312, 323, 324, 326, 327, 399, 403, 404
 Conteben 45
 contenitori dei campioni 127, 132, 341, 342, 344, 345, 349, 357, 373, 387
 contraccettivi orali e terapia antitubercolare 81
 controllo di qualità, vedi qualità
 controllo interno di amplificazione 267-271, 278, 356, 395
 conversioni nei test IGRA 326, 332
 Coopmans 15
 Corday, Michel 39
 Cornil, Victor André 30
 coroide, lesioni della 69, 73
 Corvisart, Jean Nicolas 20
Corynebacterineae 54
Corynebacterium 53, 146
 cotrimossazolo (trimetoprim/sulfametossazolo) 95, 100, 104, 228, 231-233, 235, 236, 401
 crescita lenta, micobatteri a 54-57, 90, 91, 94, 97, 99, 104, 146, 188-191, 227, 228, 231, 233, 385, 401
 crescita rapida, micobatteri a 54-57, 89, 90, 101, 105-107, 109, 110, 146, 187-191, 193, 232, 233, 235, 236, 385, 401
 critica, concentrazione di un farmaco 213, 222, 226
 Croce di Lorena 41
 Crohn, morbo di 110, 111
 cromatografia su strato sottile (TLC) 194, 195
 cromatografia dei lipidi micobatterici 4, 187, 192-195, 202
 cross-contaminazione di laboratorio, vedi contaminazioni crociate
 cross-resistenza ai farmaci, vedi farmaco-resistenza
 CRR (Centro Regionale di Riferimento) 360, 361
Cryptosporidium 146
C_T (threshold cycle) 126, 265, 273
Culture Filtrate Protein 10, vedi CFP-10
 curettage dell'endometrio 126, 129, 389
 curve di fusione 266, 267
 curve di *melting* 266
 cutaneo, test, vedi Mantoux
 cute
 infezioni da micobatteri 29, 53, 68, 73, 89, 102, 104-107, 163, 233, 341, 342, 369, 377, 401
 raccolta del campione 126, 128, 132, 389
 cuticonversione 80, 344, 358
Cyclospora 146
- D**
- D.L. n. 81 del 9 aprile 2008, Testo Unico in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro 339, 340, 357, 362
 da Monte Giovan Battista, detto "Montano" 13
 Dalmer 45
 Dante Alighieri 10
 DAT (test di amplificazione diretta), vedi amplificazione
 database 57, 195, 196, 204, 206, 303, 310
 DDBJ 206
 De Cereville, Edouard 32
 decontaminante 156-161, 375, 385, 393
 decontaminazione 153-184, 220, 268, 278, 344, 350, 373, 375, 393
 metodo con NALC-idrato di sodio 156-158
 metodo con acido ossalico 159
 metodo con acido solforico 159, 160
 metodo con idrato di sodio 4% (metodo di Petroff) 158

ridecontaminazione 161
 sistemi commerciali 160, 161
 Deir-el-Bahri, tempio di 36
 dendrogramma 56
 derivato proteico purificato, vedi PPD
 Dettweiler, Peter 39
dfrA 243
 dialisi, pazienti in 110
 diarrea 108, 110
 Dickens, Charles 19
Direct Repeat, vedi DR
Directly Observed Therapy Short-course, vedi DOTS
Directly Observed Therapy, vedi DOT
 discordanze fra IGRA e intradermoreazione di Mantoux 327
 disinfettanti 340, 343, 350, 351, 357
 disinfezione 16, 22, 178, 340, 343, 344, 349-351, 357
 Dispensario Funzionale Aziendale 362
 dispositivi di protezione individuale, vedi protezione individuale, dispositivi di
 disseminata, infezione micobatterica 69, 71, 73, 89, 75, 104, 105, 107-110, 126, 132, 229, 241, 370, 371, 386, 387, 400
 tubercolosi 69, 71-73, 75, 126, 132, 241, 370, 371, 386, 387
 micobatteriosi 89, 104, 105, 107-110, 132, 386, 387, 400
 DL 196/99 371
 DM 592/95 371, 372
 DNA girasi 246, 247
 DNA-polimerasi 264, vedi anche polimerasi
 DNA-Probe 91, 187, 196
 Domagk, Gerhard 45
 DOT (*Directly Observed Therapy*) 63, 78, 79
 DOTS (*Directly Observed Therapy Short-course*) 63, 64
 doxiciclina 102, 104, 106, 228, 231-233, 235, 236, 401
 DPR 465/2001, Obbligo alla vaccinazione antitubercolare 80, 343, 358
 DR (*Direct Repeat*) 303-305, 308, 310
droplet nuclei 340, 341, 345-347
 Duiker, Jan 37
 Dumarest 31
 Dumas, Alexandre figlio 20
 Duplessis, Marie 19
 Dupuytren, Guillaume 21

E

Early Secretory Antigen Target 6, vedi ESAT-6
 Ebstein, Erich 3, 19
 ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) 324-327, 328
 ecografia 73, 126
 EDTA (acido etilen-diamino-tetra-acetico) 128-130, 132, 161, 174, 197, 307, 308, 331, 389
 egizia, tubercolosi nell'antica cultura 4, 5, 7
 Ehrlich, Paul 23-25, 30
eis 242, 246, 253
 elementi genici mobili 241
 elettroferogramma 205, 206, 417
 elica 10 55
 18 55, 99, 205
 elioterapia 37, 38
 ELISPOT (*Enzyme-Linked Immunospot*) 324, 330, 331
 eluizione in agar, antibiogramma per 219
 ematuria 71, 74, 131
embB 242, 244, 251-253
embC 242, 244
 EMBL 206
 emina 103, 163
emi-nested RT-PCR 272
 emocoltura 110, 128, 129, 132, 167, 169, 174, 176, 177, 197, 386-389
 indicazioni 387
 raccolta 129, 132, 389
 terreni 174-177
 emottisi 6, 11, 18, 19, 30, 31, 70, 71, 90, 92, 95-99, 101, 125
 empiema 9, 30, 32, 68, 74, 130
 encefalo 70, 75, 126, vedi anche sistema nervoso centrale
 epidemia 64, 66, 273, 323, 327, 403
 endometrio 126, 129, 132, 389
 endoscopia 126, 131
endpoint 229, 234
 enoil-ACP reduttasi 242
Enterococcus faecalis, ATCC 29212 230, 236
 enzima *PvuII* 290, 292
Enzyme-Linked Immunospot, vedi ELISPOT
 eparina 128-130, 174, 331, 389
 epatite e terapia antitubercolare 81
 EpiCenter 223, 226

epidemia 26, 35, 39, 42, 64, 89, 289, 290, 310-313

epidemiologia
 molecolare della tubercolosi 287, 289, 291, 293, 295, 297, 301, 303, 305, 307, 310-313, 315, 317, 363, vedi anche molecolare, epidemiologia
 della tubercolosi 22, 23, 89, 95, 99, 248, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 310-313, 315, 317, 363
 delle micobatteriosi 89-90

epididimite 74

epitelioidi, cellule 67

epitubercolosi 69

equità di accesso alle strutture sanitarie 360

Erodoto 8

ertapenem 235

esame colturale, vedi colturale, esame

esame microscopico, vedi microscopico, esame

ESAT-6 (*Early Secretory Antigen Target 6*) 323, 324, 328-330, 332

Escherichia coli, ATCC 25922 147, 164, 385

escreato (espettorato) 71, 80, 91, 126-130, 132, 155, 387-389

espettorato indotto 127-130, 155, 387, 388

espettorato, vedi escreato

esteri di acridinio 196, 267

esteri metilici della parete cellulare 193

estetica, chirurgia 106

estratto proteico purificato, vedi PPD

estrazione
 degli acidi micolici 192-195
 dell'acido nucleico 204, 248, 249, 268-272, 274, 278, 291, 298, 302, 378, 380, 395
 dell'ago da un flacone 341
 dell'aria 346-348
 della niacina 191
 delle proteine di *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) 26
 sistema MALDI-ToF 196

etambutolo 46, 79-81, 93-100, 102, 104-106, 109, 213, 215, 219, 221-223, 226, 228, 230-232, 242, 244, 251-253, 398-401

E-test 232

ethA 242, 243

EthA, monoossigenasi 243

ethR 243

etidio, bromuro di 266

etilene, ossido di 350

etionamide 45, 214, 215, 223, 228, 242-244, 247, 398

etisia 8

Europa, tubercolosi in 3, 5

European Center for Disease Prevention and Control, vedi ECDC

European Food Safety Agency 369

extensive drug resistance, vedi XDR

extrapolmonari, campioni 248, 263, 264, 269-271, 273, 274, 276, 277, 279, 371, 395

extrapolmonari, lesioni 30, 44, 65, 67

F

falsi negativi 127, 146, 170, 253, 278, 404

falsi positivi 146, 253, 278, 279, 395

famiglia Beijing, vedi Beijing

famiglie di micobatteri 3, 304, 308, 310, 313

famiglie di *Mycobacterium tuberculosis* e *Spoligotyping* 304

farmaci antitubercolari 41, 43, 45, 96, 101, 106, 165, 166, 213, 214, 226, 241, 355, 358, 397, 398, 399, 405
 di prima linea (scelta) 77, 96, 213, 214, 222-227, 356, 358, 363, 398, 399, 405
 di seconda linea (scelta) 64, 231, 214, 223, 227, 241, 242, 245, 246, 251, 252, 356, 359, 363, 397, 398, 399, 405

farmaco
 frazione attiva 214
 potenza 214
 purezza 214
 solventi 214

farmaco-resistenza 57, 64, 93, 69, 100, 101, 106, 163, 178, 229-232, 235, 241-257, 275, 363, 398-400
 cross-resistenza 243, 246, 247
 dei MNT 57, 93, 96-100, 101, 178, 106, 229-232, 235
 diagnosi molecolare, vedi antibiogramma molecolare
 epidemiologia 63-67, 399
 in Italia 399
 intrinseca 213, 241, 399
 marker di 399
 MDR, vedi MDR
 prevenzione dell'insorgenza delle 64
primer 253
 secondaria 398
 XDR, vedi XDR

fase mobile 192

fase stazionaria 192

fattore cordale 376

fattori di crescita 155, 163

FDA (US Food and Drug Administration) 77, 222, 268, 269, 324

- febbre 6, 7, 9, 19, 20, 25, 71, 73-75, 81, 90, 92, 95, 96, 100, 108, 110, 125, 370, 387
- feci 128, 131, 132, 155, 387, 389
- Feldman, Hugh William 43
- fenolici, disinfettanti 350, 351
- FFP3, maschera respiratoria 80, 343, 345
- fibrinogeno 130
- fibrosi cistica 90, 93, 101, 160
- Filippo I, re 12
- filogenesi dei micobatteri 54, 56, 308, 309
- filogenesi e *Spoligotyping* 308, 309
- filogenetica, analisi 56, 99, 297
- filogenetici, marcatori 57, 244
- filtrazione dell'aria 347
- filtrazione, sterilizzazione mediante 350
- Finsen, Niel 38
- fissativi 127-129, 132, 373, 389
- fissazione del vetrino 142, 147, 343
- fistolizzazione 29, 68, 69, 74, 102, 106
- fitoemoagglutinina 324, 329, 330
- Fleming, Alexander 43
- flora residente 155, 162, 393
- fluidificante 156, 161
- fluidificazione dei campioni 155, 157
- Fluorescence Resonance Energy Transfer*, vedi FRET, sonde
- fluorescenza
 amplificazione 266, 271, 272
 metodo di rilevamento di crescita 165-167, 169, 172, 221, 222, 376
 microscopia 142, 144, 148, 149
 sequenziamento 204
- fluorimetrico, rilevamento 167
- fluorochinoloni 64, 94, 96, 98, 102, 109, 131, 213, 231, 235, 242, 246, 247, 251-253, 397, 399, 401
- fluorocromi 68, 141, 142, 144, 190, 204, 205, 221, 266, 356
- focolaio primario di infezione 68
- follow-up della terapia, vedi terapia
- Food and Drug Administration, vedi FDA
- Forlanini, Carlo 30, 31
- Forlanini, Enrico 31
- formaldeide 163, 350, 351
- formalina 128, 129, 132, 350, 373, 389
- formazano 166
- fotocromogeni, micobatteri 94, 104, 190, 191
- Fracastoro, Girolamo 13, 15, 22
- Franziscus de la Boe di Amsterdam, detto Silvius 14
- frattura ossea 106, 107
- frazione attiva di un farmaco 214
- frenico-exeresi 32
- frenicotomia 32
- frenofrassi 32
- FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), sonde 266, 267
- Friedrich 32
- Fruchaud 32
- fucsina 23, 24 (vedi carbolfucsina)
- fumo (tabagismo) 90, 97, 99, 341, 324
- furA* 242
- fusione, curve di 266, 267
- G**
- gabbia toracica, anomalie della 90, 92
- Galeno 9, 10, 14
- Galilei, Galileo 18
- Gasromatografia (GLC) 193
- Gas-Liquid Chromatography* (GLC) 193
- gastrico, aspirato, vedi aspirato
- gatifloxacin 213, 231, 235, 397
- GenBank 206
- GeneMapper* 297, 302
- genere *Mycobacterium* 3, 53, 54, 56-58, 99, 198, 201, 202, 271, 378, 379, 385
- genetica delle popolazioni e *Spoligotyping* 308
- genetici, difetti 325
- GeneXpert MTB/RIF System 272
- GenoCard 278
- genoma micobatterico 53, 54, 57, 196, 264, 265, 289, 290, 297, 304, 309, 310, 323, 380, 394, 397, 399
- genotipizzazione, vedi molecolare, epidemiologia
- genotipo VNTR ECDC 0002 313
- genotipo tubercolare 54, 56, 252, 298, 303, 309, 310-313
- GenoType MTBC 196, 200
- GenoType MTBDRplus 249, 250
- GenoType MTBDRsl 250, 251
- GenoType Mycobacteria Direct 269, 270
- GenoType *Mycobacterium* 196-199
 reazioni crociate 199
- Gen-Probe 100, 196

- Ghon, Anton 30
 Ghon, focolaio primario di 68
gidB 242, 246
 girasi, DNA 246, 247
 Girolamo Fabrizio di Acquapendente 13
 GLC (*Gas-Liquid Chromatography*) 193, 194
 glutaraldeide 295, 350, 351
 Goethe, Johann Wolfgang von 18
 Gontrano 12
Gordonia 53, 146
 Gottsacker, terreno 162
 Gould, Pearce 30
 Grafton, Milne Joseph 36
 Gram, colorazione di 24, 53, 110, 141, 161, 198, 199, 249
 Gram, Hans Christian 24
 Grancher, Jacques-Joseph 30
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 109
 granuloma tubercolare (tubercolo) 4, 14, 15, 21, 22, 67-69, 71, 73, 91, 369, 370, 372, 374, 375, 402, 412
 gravidanza 79
 greca, tubercolosi nell'antica cultura 8, 9, 19
 Griffith, Arthur Stanley 29
 Griffith, Frederick 29
 Gruft, terreno 163
 gruppi a rischio di tubercolosi 64, 254
 Gruppo di Lavoro Micobatteri dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani 359
 GU n. 40 del 1999 358, 362
 GU (unità di crescita) 226
 guanti 126, 156, 342, 345
 Guérin, Camille 34, 35
 Gutenberg, Johann 13
 Guy de Chauliac 12
gyrA 242, 246, 251-253
gyrB 200, 242, 246, 253, 378, 379
- H**
- HaellI*, enzima di restrizione 203, 204
 Hammurabi, Codice di 7
 Harraden, Beatrice 39
Health Technology Assessment (HTA) 276
heat shock protein 203
 Henle, Friedrich Gustav Jakob 22, 24
 HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*) 340, 346-348, 350, 357
- Herard 30
High performance liquid chromatography, vedi HPLC
 Hinshaw, Horton Corwin 43
 HIV 63, 66, 72, 77, 78, 80, 89, 105, 107-109, 125, 130, 131, 230, 241, 323, 325, 387, 400, 403
 Holboell, Einar 40
home-made, (*in-house*) metodiche per
 amplificazione genica 263, 264, 276, 380
 MIRU-VNTR 302
 resistenze genotipiche 252
 sequenziamento 205
hot tub lung 92, 93
hot-spot, regione del gene *rpoB* 243, 248, 249
 Hovius 15
 HPC (cetilpiridinocloruro) 375
 HPLC (*High performance liquid chromatography*) 97, 98, 100, 192, 193
hsp65 203, 205
 HTA (*Health Technology Assessment*) 276
 Huant, Ernst 45
Hybridization Protection Assay 267
- I**
- iatrogena, patologia 89, 106, 108, 109, 322
 ibridazione inversa 94, 97-100, 105, 197, 198, 200, 201, 248-250, 269, 270
 ibridazione, vedi ibridizzazione
 ibridizzazione 94, 97-100, 105, 196-201, 248-251, 265-267, 269, 270, 290, 295, 303, 306, 307
 identificazione dei micobatteri 187-208, 359, 376, 379, 392
 analisi dei lipidi della parete micobatterica 192-195
DNA-probe 196-202
 PCR *restriction analysis* (PRA) 203, 204
 sequenziamento genico 204-208
 spettrometria di massa 195, 196
 test biochimico-colturali 187-192
 test immuno-cromatografici (identificazione di *Mycobacterium tuberculosis*) 202, 203
 idoneità dei campioni 128, 129, 131-133, 388, 389
 idrato di sodio 4% (metodo di Petroff) 158
 idrato di sodio 156, 158-160
 idrolisato di caseina 163, 167, 172, 216
 IFN- γ (Interferone-Gamma) 77, 109, 323, 324, 327-332, 402, 404
 igiene bronchiale 92, 94
 IGRA (*Interferon-Gamma Release Assay*) 322-328, 332, 402-405

- diagnosi di tubercolosi attiva 327, 404
differenze con intradermoreazione di Mantoux 402-404
discordanze con intradermoreazione di Mantoux 327
follow-up di terapia 327, 404
inquadramento 76, 77, 323, 324, 402-404
linee guida 77, 324, 327, 404
refertazione 332, 404
sensibilità 324-326, 402
specificità 326, 402
test commerciali 328-332
- Iliade 8
- imaging, diagnosi per 4, 73, 125, 126, vedi anche radiologico, esame
- imipenem 101, 106, 233, 235, 236, 401
- immagini, diagnosi per 4, 73, 125, 126, vedi anche radiologico, esame
- immigrazione 66, 67, 72, 82, 323, 403
- immunità cellulo-mediata, vedi cellulo-mediata, risposta immunitaria
- immunitari, deficit 322, 404
- immuno-cromatografici, test 202
- immunodeficienza, vedi immunodepressione; immunosoppressiva, terapia; immunitari, deficit
- immunodepressione 35, 68, 70, 71, 77, 105, 107-109, 125, 129, 163, 241, 289, 325, 329, 386, 387, 402
- immunoprofilassi, vedi vaccinazione
- immunoricostituzione, sindrome da (IRIS) 104
- immunosoppressiva, terapia 77, 107, 322, 323, 325, 327, 403
- inalazione, di agenti biologici 89, 341
- incenerimento 345, 350
- incidente biologico 343
- incidenza di tubercolosi 63, 65, 313, 355
- indeterminato, risultato in test
di amplificazione 395, 396
IGRA 325, 330-332, 404
- indiana, tubercolosi nell'antica cultura 6
- indice di trasmissione della tubercolosi 310, 312
- indice, caso di tubercolosi 289, 290, 309-312, 324
- infantili, patologie, vedi pediatrici, pazienti
- infezione tubercolare latente 26, 66, 68, 72, 73, 76-80, 289, 313, 321-327, 329, 331-333, 335, 344, 355, 370, 402, 404
definizione 76, 321
diagnosi 76, 77, 321-332, 402-404
IGRA, vedi IGRA
intradermoreazione secondo Mantoux, vedi Mantoux
QuantiFeron TB Gold, vedi QuantiFeron TB Gold e IGRA
- T-SPOT.TB, vedi T-SPOT.TB e IGRA
terapia 77-79, 321, 324-326, 332
- infezioni micobatteriche miste 108
- infiltrato polmonare 72, 73, 90, 92, 95, 97, 99, 100, 125, 129
- infortunio sul lavoro 343
- ingestione di agenti biologici 28, 341, 369, 371
- inhA* 242, 243, 249, 250, 253, 399
- in-house*, metodiche, vedi *home-made* metodiche
- inibitori dell'amplificazione 268, 278-380, 395-397
- inibitori delle proteasi 78, 81, 230, 400, vedi anche antiretrovirale, terapia
- INNO LiPA Mycobacteria 196, 201, 202
reazioni crociate 202
- INNO-LIPA Rif.TB 248
- inoculazione di agenti biologici 22, 24, 89, 341, 342
- inserzione, sequenza 6110 di, vedi IS6110
- INSTAND (Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory) 148, 174, 208, 226, 227, 275
Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory, vedi INSTAND
- interferone- γ , vedi IFN- γ
- Interferon-Gamma Release Assay*, vedi IGRA
- Internal Transcribed Spacer*, vedi ITS
- International Union Against Tuberculosis (IUAT) 41
- International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) 41
- International Union Tuberculosis Medium (IUTM) 162
- intradermoreazione secondo Mantoux, vedi Mantoux
- intraospedaliere, infezioni 89
- invio dei campioni 127, 131, 132, 179, 363, 387, 388
- iodofori 351
- ipersensibilità di tipo ritardato, vedi cellulo-mediata, risposta immunitaria
- Ippocrate 8- 11, 14, 19, 20
- ipronazide 45
- IRIS (sindrome infiammatoria da immunoricostituzione) 104
- IS6110 4, 241, 242, 244, 264, 265, 268, 289-292, 296, 297, 310, 312, 313, 373, 380
- isolamento dei pazienti 16, 28, 39, 40, 80, 129, 130, 141, 149, 276, 355, 386, 390, 394, 396
- Isolator 128, 129, 132, 174-176, 389
- isoniazide 45, 64, 67, 77-81, 94-97, 99, 100, 163, 213, 215, 219, 221-223, 226, 228, 230, 231, 241-244, 247, 249, 250, 253, 397-401

isoniazide, intolleranza a 79
 isoniazide-resistenza, base molecolare 242, 243, 249, 250
 Istituti Zooprofilattici Sperimentali, vedi IZS
 ITL, vedi infezione tubercolare latente
 ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 56, 201, 205, 206
 IUAT (International Union Against Tuberculosis) 41
 IUATLD (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease) 41
 IUTM (International Union Tuberculosis *Medium*), terreno 162
 IZS (Istituti Zooprofilattici Sperimentali) 372, 373, 377

J

Jacobaeus, Hans Christian 32
 Jansenn, Zacharis 18
 Jeanneret, Charles Edouard 37
 Jenner, Edward 33
 Johne, morbo di 110

K

kanamicina 46, 64, 213-215, 223, 227, 242, 245-247, 251, 253, 397-399
kasA 242
katG 242, 243, 249, 250, 253, 399
 KatG, catalasi-perossidasi 243
 Keats, John 18
 Kinyoun, colorazione di 142, 143, 145, 374
 Kirchner, terreno di 166
 Kitasato, Shisaburo 25
 Klebs, Theodor 23
 Klenked, Philipp 22
 Klostock, Robert 32
 Koch, Heinrich Hermann Robert 23-29, 33, 36, 40, 321
 Koelsch, Franz 41
 Konzan, Goto 7
 Kushner 45

L

Laboratorio di base 358
 laboratorio di micobatteriologia 323, 339, 341-343, 345, 347-349, 351, 355, 357-359, 361, 363-365, 403, 405
 generalità 355
 livello di attività 358-360, 362-364
 rete 358, 361, 362, 372
 riordino 359-364

situazione in Italia 359
 standard di sicurezza 357, 358, vedi anche sicurezza
 standard diagnostici 355, 356
 standard organizzativi 358
 Laboratorio di Riferimento, vedi Riferimento, Centro
 Laboratorio Regionale 358
 Laboratorio Sopranazionale di Riferimento OMS 227
 Laboratorio Unico Regionale (LUR) 361, 362
Lady Windermere, sindrome di 92-94
 Laennec, René Theophile Hyacinthe 20-22
 LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) 275
 Landouzy, Louis 30
 Langhans, cellule giganti di 67, 374
 laparoscopia 75
Latent Tuberculosis Infection, vedi infezione tubercolare latente
 latente, tubercolosi, vedi infezione tubercolare latente
 lavaggio bronco-alveolare (BAL) 91, 93, 129, 130, 155, 387, 400
 lavaggio gastrico, vedi aspirato gastrico
 Lawrence, David Herbert 19
 Le Corbusier 37
 lebbra 8, 46, 53, 105
 LED (*Light Emitting Diode*) 149, 173
Legionella micdadei 146
 Lehmann, Jorgen 44, 45, 53
 Lenin, Vladimir Illyich 27
 lenta crescita, micobatteri a, vedi crescita lenta, micobatteri a
 leucemia 77, 110, 323, 403
 levofloxacina 214, 215
Light Emitting Diode (LED) 149
LightCycler, strumentazione 267
Line Probe Assay (LiPA) 198, 248
 linee guida 77, 93, 127, 324, 327, 339, 344, 346, 357, 360-362, 398, 404
 controllo della malattia tubercolare 360-362
 raccolta di campioni di escreato 127
 sicurezza sul lavoro 339, 344, 346, 357
 standard di riferimento nei laboratori di micobatteriologia 355-358, 398
 terapia da MAC 93
 utilizzo degli IGRA 77, 324, 327, 404
 linezolid 102, 104, 106, 214, 215, 223, 228-231, 233, 235, 236, 398, 401
 linfadenopatia 13, 15, 67-70, 72, 73, 102-104, 106,

108, 125, 126, 128, 131, 277, 370, 372, 373, 380, 389, vedi anche scrofolà

linfociti CD4+ 108, 109, 325, 387

linfociti T 70, 76, 110, 323, 324, 328, 402, 404

linfoma 77, 105, 323, 403

linfonodi, vedi linfadenopatia

LiPA, vedi *Line Probe Assay*

lipidi della parete micobatterica 5, 53, 70, 141, 187, 192, 193, vedi anche acidi micolici, acidi grassi, cere

liquidi, terreni 97, 155, 157, 164, 165, 175, 348, 372, 376, 385, 393, 398

liquido

- ascitico 126, 130
- cavitario 128, 130, 155, 156, 332, 389, 393
- cefalo-rachidiano (liquor) 126, 128, 131, 142, 155, 268, 273, 277, 389, 393
- pericardico 69, 75, 126, 128, 130, 389
- peritoneale 128, 130, 370, 389
- pleurico 74, 125, 126, 128, 130, 277, 389
- sinoviale 130

liquor (liquido cefalo-rachidiano) 126, 128, 131, 142, 155, 268, 273, 277, 389, 393

lisi-centrifugazione, metodica di 174, 175

Lister 43, 29

livello di biosicurezza, vedi biosicurezza

livello di attività del laboratorio 358-360, 362-364, vedi anche laboratorio di micobatteriologia

lobectomia 33

locus genico 249, 252, 297-304, 308-310, 399, 418

Loeffler, Friedrich 25

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 275

Lorena, croce di 41

Löwenstein-Jensen con PACT, terreno 163

Löwenstein-Jensen selettivo, terreno 163

Löwenstein-Jensen, terreno 162, 163, 190, 191, 215, 216, 220, 221, 376, 377

LTBI, vedi infezione tubercolare latente

Lubeca, incidente di 35

LUR (Laboratorio Unico Regionale) 360, 361

M

Mac Donald, Betty 39

MAC, vedi anche *Mycobacterium avium complex*

- antibiogramma per 229, 230
- criteri terapeutici secondo l'American Thoracic Society 93
- quadri clinici 92

terapia 93, 94

test di sensibilità 93

Macbeth 11

macrofagi 67, 70, 109, 246, 313, 374, 391

macrolidi 93, 94, 97, 98, 109, 229, 231, 232, 235, 400

MAIX (*Mycobacterium avium-intracellulare "cluster X"*) 91

MALDI, tecnica 195, 196

MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*) 195, 196

Mally, Joseph 45

management di un caso tubercolare 80, 81

Manget, Jean-Jacques 14

Mangetus, Jean-Jacques 14

Mann, Thomas 19, 20, 39

Mantoux, intradermoreazione secondo (TST) 26, 70, 76, 77, 321-328, 332, 402-404, vedi anche tubercolina

- criteri interpretativi 323, 403
- differenze con IGRA 402-404
- discordanze con IGRA 327
- inquadramento 76, 321-323, 402-404
- sensibilità in confronto a IGRA 324-326, 402-404
- specificità in confronto a IGRA 326, 402-404
- storia 25, 26

Mantoux, Charles 26

Maragliano, Edoardo 34

Marten, Benjamin 18

Marx, Karl Heinrich 27

maschera filtrante FFP3 80, 343, 345

maschera respiratoria 80, 126, 341, 343, 345

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight, vedi MALDI-ToF

MB Redox, sistema 166, 415

MB/BacT *enrichment fluid* 167, 170, 177

Mc Fadyean 28

MDR 64, 65, 67, 79, 213, 226, 241, 242, 248, 251-254, 356, 397-399

Medioevo, tubercolosi nel 11

melting, curve di 266

Mengele, Joseph 42

meningite tubercolare 6, 14, 44, 69, 72, 75, 80, 126, 371

mesopotamica, tubercolosi nell'antica cultura 7

metanolo 142, 214, 215

Method Other Than Acceleration (MOTA) 269

metiltransferasi 245, 246

metodo delle proporzioni, vedi proporzioni, metodo delle

- Meusnier 30
- Meyer, Hans 45
- MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*) 165, 166, 169, 203, 221, 225, 415, 417
- MGIT 960, sistema automatico 167, 168, 215, 221-223, 226, 244
per farmaci di seconda scelta per MTC 223
- MGIT SIRE kit 222
- MGIT *TbC Identification Test* 203
- MIC 213, 227, 229-236, 244
- micetoma 71
- micobatteri
a crescita lenta 54-57, 90, 91, 94, 97, 99, 104, 146, 188-190, 191, 227, 228, 231, 233, 385, 401
a crescita rapida 54-57, 89, 90, 101, 105-107, 109, 110, 146, 187-191, 193, 232, 233, 235, 236, 385, 401
fotocromogeni 94, 104, 190, 191
non cromogeni 91, 97, 190, 191, 235
non tubercolari, vedi MNT
scotocromogeni 99, 190, 191
termo-tolleranti 55, 56
- micobatteri ambientali potenzialmente patogeni (PPEM) 53, vedi MNT
- micobatteri atipici 53, vedi MNT
- Micobatteri, Gruppo di Lavoro Micobatteri AMCLI 359, 362
- micobatteriosi 104-106, 108-110, 125, 132, 276, 327, 363, 386, 387, 390, 392, 397, 401
cutanee e dei tessuti molli 104-106
disseminate 107-110
e amplificazione 327
e intradermoreazione di Mantoux, vedi Mantoux
generalità 89, 90, 385, 386
linfadenopatie 102-104
osteo-articolari 106, 107
polmonari 90-102
raccolta di campioni in 125, 132, 386-390
terapia, vedi MNT
- micobattina 110
- micosi 90
- microarray 252
- microchip 252
- microdiluzione in brodo 106, 227, 229-233, 235, 236, 400
- microscopico, esame 141-151, 155, 174, 355, 356, 374, 376, 390-394, 398
controllo di qualità 147, 148
falsi negativi e positivi 146, 147, 391
limiti 146, 147
- metodi di colorazione 142-145
osservazione microscopica 148, 390
refertazione 149, 150, 385, 391
sensibilità 141, 142, 146, 390
sistema di illuminazione 149
specificità 141, 142, 390
striscio del vetrino 141, 142
terapia e 147, 391
- microscopico-negativi, campioni 178, 248, 250, 279, 394
- microscopico-positivi, campioni 147, 394
- Microseq 206
- Middlebrook 7H10, terreno 161, 163, 164, 190, 215-221, 223, 376, 377
- Middlebrook 7H11, terreno 161, 163, 164, 190, 215, 216
- Middlebrook 7H12, terreno liquido 167
- Middlebrook 7H9, terreno liquido 155, 163, 165, 167, 169, 170, 172, 175, 176, 216, 218, 219, 226, 376, 377
- MIDI, cromatografo 192
- midollare, biopsia o aspirato 108, 378
- midollo emopoietico (osseo) 126, 128, 132, 155, 389
- midollo osseo, vedi midollo emopoietico
- midollo spinale 74
- miliare, tubercolosi 14, 15, 21, 35, 69, 70, 73, 80, 126, 131, 174, 371, 386, 387
- Ministero della Salute 64, 356, 358
- minociclina 104, 231-233, 235, 236
- MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*) 297
- MIRU-VNTR 297-303, 309-312, 418, vedi anche MIRU-VNTR 24
a 12 loci 297
a 15+9 loci (vedi MIRU-VNTR 24)
a 24 loci (vedi MIRU-VNTR 24)
potere discriminatorio 297
riproducibilità 298
- MIRU-VNTR 24 297-303, 310, 311
metodica automatizzata 297, 299-303
metodica manuale 297-300
primer 299, 300
protocollo operativo 298-303
- misure di contenimento del rischio di infezione ad agenti biologici 339, 340, 357
- Mitchison, terreno di 163
- mitogeno, in test IGRA 325, 329-332, 404
- mitrale, prolasso della 90
- mitto, in raccolta delle urine 129, 131, 389
- MLSA (*Multi-Locus Sequence Analysis*) 309

- MNT (micobatteri non tubercolari) 53, 77, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 115, 117, 119, 121, 129, 148, 149, 162, 168, 170, 172-174, 178, 187, 213, 227, 228, 231, 233, 269, 277, 322, 323, 328, 332, 341, 359, 386, 390, 392, 394-397, 400, 401, 403, 405
 antibiogramma 227-236, 400, 401
 antibiogramma per MAC (*Mycobacterium avium* complex) 229, 230, 400
 antibiogramma per MNT a lenta crescita 227-232, 400, 401
 antibiogramma per MNT a lenta crescita diversi da MAC, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii* 231, 232
 antibiogramma per MNT a rapida crescita 232-236, 401
 antibiogramma per *Mycobacterium kansasii* 230, 231, 400
 antibiogramma per *Mycobacterium marinum* 231, 401
 contagiosità 89
 epidemiologia 89, 90
 infezioni cutanee e dei tessuti molli 104-106
 infezioni disseminate 107-110
 infezioni osteo-articolari 106, 107
 infezioni polmonari 90-102
 linfadenopatie 102-104
 patogenicità 89, 90
 specie, elenco 188-190
 tassonomia 89, 188-190
- Modigliani, Amedeo 20, 411
- molecolare, epidemiologia 66, 69, 178, 252, 275, 289-313, 359, 363, 372, 373, 394
 gold standard dei metodi 309, 310
 MIRU-VNTR 297-303, vedi MIRU
 RFLP di IS6110 289-296, vedi RFLP
 Spoligotyping 303-309, vedi Spoligotyping
 utilizzo dei diversi metodi 309, 310
 utilizzo dei metodi e gestione clinica 311-313
- molecular beacon, sonde 265-267, 273
- Møllgaard, Holger 43
- monoossigenasi EthA 243
- monoterapia 79, 104, 235, 246
- Montano, da Monte Giovan Battista 13
- morbo di Johne 110
- morbo di Pott 3-5, 11, 74
- morbo regio 11
- Morelli, Eugenio 31
- Morelli, Villaggio Sanatoriale 37, 38
- morfazinamide 45
- morfologia dei micobatteri 34, 35, 53, 148, 187, 190, 376, 390
- Morgagni, Gian Battista 14, 15, 21
- mortalità
 per micobatteriosi 94, 96, 97, 99, 101, 102
 per tubercolosi 26, 33, 35, 41, 44, 63, 65, 241
 per tubercolosi, tasso di 63, 65
- Morton, Richard 14, 17, 19, 21
- MOTA (*Method Other Than Acceleration*) 269
- MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*), vedi MNT 53
- moxifloxacina 95, 100, 106, 213-215, 223, 228-233, 235, 236, 251, 397, 398, 401
- MPB70, gene 377
- MPT64, proteina 202, 203
- mshA* 243
- MTI4323, *Mycobacterium tuberculosis* 292
- MTD2 (*Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test*) 267, 268, 270, 273, 274, 276
- multidrug resistance, vedi MDR
- Multi-Locus Sequence Analysis (MLSA) 309
- multiplex, PCR 200, 248, 249, 252, 266, 297, 378, vedi triplex, quadruplex
- mummie 3-5
- Munch, Edvard 41, 42, 411
- Murphy, Benjamin John 31
- mutazioni geniche 54, 109, 200, 229, 241-254, 273, 399
- mutazioni missense 244
- Myco/F Lytic* 132, 175, 176
- Myco/F Sputa* 172, 175
- Mycobacteria Other Than Tuberculosis* (MOTT) 53, vedi MNT
- Mycobacteriaceae*, famiglia 54
- Mycobacterial Growth Indicator Tube*, vedi MGIT
- Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*, vedi MIRU
- Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeat*, vedi MIRU-VNTR
- Mycobacterium abscessus* 56, 101, 102, 106, 108, 110, 188, 198, 199, 203, 232, 234, 401, 412
- Mycobacterium africanum* 5, 58, 63, 200, 279, 309, 339, 378, 385, 391, 395
- Mycobacterium agri* 188
- Mycobacterium aichiense* 188
- Mycobacterium algericum* 58, 188
- Mycobacterium alsicense* 199
- Mycobacterium alvei* 188, 198, 202
- Mycobacterium aromaticovorans* 188

<i>Mycobacterium arosiense</i>	58, 91, 188, 197, 199	<i>Mycobacterium colombiense</i>	58, 91, 108, 188, 197, 199
<i>Mycobacterium arupense</i>	188	<i>Mycobacterium conceptionense</i>	188, 199, 202
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	56, 107, 188, 198, 199	<i>Mycobacterium confluentis</i>	188
<i>Mycobacterium aubagnense</i>	188, 199	<i>Mycobacterium conspicum</i>	188
<i>Mycobacterium aurum</i>	56, 188	<i>Mycobacterium cookii</i>	188
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	188	<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	188
<i>Mycobacterium avium</i>	56, 57, 91-93, 103, 108, 110, 111, 177, 188, 190, 192, 194, 196-199, 201-203, 269, 339, 378, 379, 386, 401, 417	<i>Mycobacterium crocinum</i>	188
<i>Mycobacterium avium avium</i>	110	<i>Mycobacterium diernhoferi</i>	188
<i>Mycobacterium avium complex (MAC)</i>	57, 58, 89, 91, 99, 162, 163, 165, 168, 172-174, 176, 187, 196, 197, 202, 227, 229, 230, 376, 378, 386, 387, 400, 401, vedi anche MAC	<i>Mycobacterium doricum</i>	188
<i>Mycobacterium avium complex, ATCC 700898</i>	230	<i>Mycobacterium duvalii</i>	188
<i>Mycobacterium avium hominissuis</i>	110	<i>Mycobacterium elephantis</i>	56, 103, 188
<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	110, 111	<i>Mycobacterium engbaekii</i>	58, 188
<i>Mycobacterium avium silvaticum</i>	110	<i>Mycobacterium europaeum</i>	58, 188
<i>Mycobacterium avium-intracellulare "cluster X" (MAIX)</i>	91	<i>Mycobacterium fallax</i>	188
<i>Mycobacterium bacteremicum</i>	188	<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	188, 199
<i>Mycobacterium boenickei</i>	188, 199, 232	<i>Mycobacterium flavescens</i>	56, 107, 188, 323, 332
<i>Mycobacterium bohemicum</i>	56, 103, 188	<i>Mycobacterium florentinum</i>	58, 100, 188
<i>Mycobacterium botniense</i>	188	<i>Mycobacterium fluoranthenivorans</i>	188
<i>Mycobacterium bouchodurhonense</i>	58, 91, 188	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	56, 101-103, 105, 106, 108, 110, 164, 166, 173, 188, 195, 198, 199, 203, 232, 235, 339
<i>Mycobacterium bovis</i>	5, 6, 58, 63, 71, 147, 162, 200, 279, 291, 296, 309, 339, 369, 371, 372, 374, 376, 378, 379, 385, 391, 395, 399	<i>Mycobacterium fortuitum complex</i>	201, 202
<i>Mycobacterium bovis BCG</i>	34, 35, 42, 58, 63, 77, 105, 200, 304, 305, 309, 322, 323, 326, 327, 332, 339, 385, 386, 399, 403	<i>Mycobacterium fortuitum group</i>	235
<i>Mycobacterium branderi</i>	100, 107, 188	<i>Mycobacterium fortuitum, ATCC 6841</i>	164, 166, 173
<i>Mycobacterium brisbanense</i>	188, 232	<i>Mycobacterium fragae</i>	188
<i>Mycobacterium brumae</i>	188	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	188
<i>Mycobacterium canariense</i>	188	<i>Mycobacterium gadium</i>	188
<i>Mycobacterium "canettii"</i>	3, 58, 63, 200, 309, 378, 385, 417	<i>Mycobacterium gastris</i>	188, 198, 199, 201, 323, 332
<i>Mycobacterium caprae</i>	58, 63, 200, 309, 376, 378, 379, 385	<i>Mycobacterium genavense</i>	56, 58, 103, 108, 109, 165, 174, 188, 198, 199, 201, 202, 391, 392
<i>Mycobacterium celatum</i>	56, 100, 101, 103, 188, 198, 199, 201, 202, 268	<i>Mycobacterium gilvum</i>	188
<i>Mycobacterium chelonae</i>	56, 101, 105, 106, 110, 148, 188, 193, 198, 199, 201-203, 232, 235, 339, 401	<i>Mycobacterium goodii</i>	56, 106, 107, 110, 188, 198, 199, 202, 232
<i>Mycobacterium chimaera</i>	58, 91, 188, 197, 199, 202	<i>Mycobacterium gordonae</i>	56, 57, 108, 147, 188, 193, 196, 198, 199, 201-203
<i>Mycobacterium chitae</i>	188, 203	<i>Mycobacterium haemophilum</i>	56, 103, 105, 107-110, 163, 188, 198, 199, 201, 202, 391, 392
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>	188	<i>Mycobacterium hassiacum</i>	188
<i>Mycobacterium chubuense</i>	188	<i>Mycobacterium heckeshornense</i>	188, 198
		<i>Mycobacterium heidelbergense</i>	58, 103, 188, 202
		<i>Mycobacterium heraklionense</i>	58, 188
		<i>Mycobacterium hiberniae</i>	58, 188
		<i>Mycobacterium hodleri</i>	188
		<i>Mycobacterium holsaticum</i>	189, 197
		<i>Mycobacterium houstonense</i>	189, 199, 232

- Mycobacterium immunogenum* 56, 107, 189, 198, 199
- Mycobacterium insubricum* 189
- Mycobacterium interjectum* 56, 58, 103, 188, 198, 417
- Mycobacterium intermedium* 58, 188, 198, 199
- Mycobacterium intracellulare* 56-58, 91, 93, 108, 177, 188, 193, 195-199, 201-203, 269, 386
- Mycobacterium intracellulare*, ATCC 13950 177
- Mycobacterium iranicum* 189
- Mycobacterium kansasii* 56, 90, 94, 96, 103, 107, 108, 110, 164, 166, 173, 188, 196, 198, 199, 201, 203, 227, 230-232, 269, 323, 327, 332, 339, 400, 401
- Mycobacterium komossense* 189
- Mycobacterium koreense* 188
- Mycobacterium kubicae* 58, 188
- Mycobacterium kumamotoense* 58, 189
- Mycobacterium kyorinense* 189
- Mycobacterium lacus* 107, 189
- Mycobacterium lentiflavum* 56, 58, 100, 103, 107, 189, 198, 199
- Mycobacterium leprae* 53, 54, 56, 89, 155, 339, 385
- Mycobacterium litorale* 189
- Mycobacterium llutzerense* 189, 199
- Mycobacterium longobardum* 58, 189
- Mycobacterium madagascariense* 189
- Mycobacterium mageritense* 102, 106, 107, 110, 189, 198, 199, 202
- Mycobacterium malmoense* 56, 90, 96, 97, 99, 103, 109, 164, 189, 198, 199, 201, 202, 231, 269, 339, 401
- Mycobacterium mantanii* 189, 199, 202
- Mycobacterium marinum* 56, 89, 104, 105, 107, 164, 189, 198, 199, 201, 202, 227, 230-232, 323, 327, 332, 339, 401, 412
- Mycobacterium marinum*, ATCC 927 230
- Mycobacterium marseillense* 58, 91, 189
- Mycobacterium microti* 58, 63, 200, 309, 339, 378, 379, 385, 386
- Mycobacterium minnesotense* 58, 189
- Mycobacterium monacense* 56, 106, 189
- Mycobacterium montefiorensis* 58, 189
- Mycobacterium moriokaense* 189
- Mycobacterium mucogenicum* 56, 110, 189, 198, 199, 232, 235
- Mycobacterium murale* 189
- Mycobacterium nebraskense* 189, 197-199, 202
- Mycobacterium neoaurum* 56, 110, 189
- Mycobacterium neworleansense* 189, 199, 202, 232
- Mycobacterium nonchromogenicum* 56, 58, 189, 193
- Mycobacterium noviomagense* 189
- Mycobacterium novocastrense* 189
- Mycobacterium obuense* 189
- Mycobacterium pallens* 189
- Mycobacterium palustre* 58, 189, 197-199
- Mycobacterium paraffinicum* 189, 197-199, 202
- Mycobacterium parafortuitum* 189, 199
- Mycobacterium parakoreense* 189
- Mycobacterium parascrofulaceum* 56, 58, 189, 199, 202
- Mycobacterium paraseoulense* 189
- Mycobacterium parmense* 58, 189
- Mycobacterium peregrinum* 56, 102, 189, 198, 199, 202, 232, 236
- Mycobacterium phlei* 56, 189, 198, 199
- Mycobacterium phocaicum* 189, 199
- Mycobacterium pinnipedii* 58, 63, 309, 378, 385
- Mycobacterium porcinum* 56, 189, 199
- Mycobacterium poriferae* 189
- Mycobacterium pseudoshottsii* 189, 202
- Mycobacterium psychrotolerans* 189
- Mycobacterium pulveris* 56, 189
- Mycobacterium pyrenivorans* 189
- Mycobacterium rhodesiae* 189
- Mycobacterium riyadhense* 189, 199
- Mycobacterium rufum* 189
- Mycobacterium rutilum* 189
- Mycobacterium salmoniphilum* 189
- Mycobacterium saskatchewanense* 58, 189, 197, 199
- Mycobacterium scrofulaceum* 56, 103, 189, 198, 199, 201, 202, 339
- Mycobacterium senegalense* 189, 199, 202
- Mycobacterium senuense* 58, 189
- Mycobacterium seoulense* 189
- Mycobacterium septicum* 110, 189, 198, 199, 202
- Mycobacterium setense* 189, 199
- Mycobacterium sherrisii* 56, 58, 100, 189, 202
- Mycobacterium shimoidei* 56, 90, 189, 198
- Mycobacterium shinjujuense* 189
- Mycobacterium shottsii* 189, 202
- Mycobacterium simiae* 55, 56, 58, 89, 99, 100, 189, 193, 195, 198, 199, 201, 202, 231, 339, 401, 417
- Mycobacterium simiae* complex 55-58, 99, 100

Mycobacterium smegmatis 56, 106, 110, 189, 198, 199, 201, 202, 232, 235
Mycobacterium smegmatis group 232
Mycobacterium sphagni 56, 189
Mycobacterium stomatopiae 58, 189
Mycobacterium szulgai 56, 90, 99, 107, 189, 198, 199, 203, 323, 332, 339, 401
Mycobacterium terrae 56, 58, 189
Mycobacterium terrae complex 55, 56, 58, 187
Mycobacterium thermoresistibile 56, 107, 190, 202
Mycobacterium "tilburgii" 58
Mycobacterium timonense 58, 91, 189
Mycobacterium tokaiense 190
Mycobacterium triplex 56, 58, 100, 190, 297, 299, 302, 303
Mycobacterium triviale 56, 190
Mycobacterium tuberculosis 3, 5, 6, 26, 35, 53, 54, 56, 58, 63, 64, 67, 70, 71, 76, 77, 81, 131, 148, 163, 164, 166, 173, 177, 191-193, 195, 203, 226, 241, 242, 244-248, 253, 268, 270, 272, 275, 290, 292, 294, 296, 304, 305, 308, 313, 321-323, 328, 330, 332, 339-341, 351, 357, 376, 378, 379, 392, 400, 402, 414, 417
Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) 3, 5, 53, 57, 58, 63, 68, 76, 89, 100, 149, 162, 168, 170, 172-174, 176, 187, 190, 191, 196-203, 213, 215, 221, 222, 227, 241, 249, 250, 252, 263-265, 267-271, 273, 275-281, 283, 285, 289, 290, 297, 298, 303, 304, 308, 309, 311, 313, 323, 356, 358, 359, 363, 378-380, 385, 386, 390-392, 394, 395, 397, 398, 399, 400, 405
Mycobacterium tuberculosis H37Ra, ATCC 25177, vedi ATCC 25177
Mycobacterium tuberculosis H37Rv, ATCC 27294, vedi ATCC 27294
Mycobacterium tuberculosis MT14323 292
Mycobacterium tusciae 190
Mycobacterium ulcerans 3, 56, 105, 148, 164, 190, 198, 199, 201, 202, 339, 385, 412
Mycobacterium vaccae 56, 190
Mycobacterium vanbaalenii 190
Mycobacterium vulneris 58, 91, 190, 197
Mycobacterium wolonskyi 190
Mycobacterium xenopi 56, 89, 97-100, 107, 108, 190, 198, 199, 201, 202, 231, 339, 401, 417
Mycobacterium yongonense 58, 91, 190
Mycobacterium, genere 3, 53, 54, 56-58, 99, 198, 201, 202, 271, 378, 379, 385
MycPrep 160
MYCOPROSAFE 161

N

N-acetil-L-cisteina, vedi NALC
N-acetiltransferasi 246
NAC-PAC EA3 161
NALC (N-acetil-L-cisteina) 156, 159, 160, 161, 268
NALC-idrato di sodio 156, 158
NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) 264, 269, 275
National Health System (NHS) 276
National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) 77, 324
nazional-socialismo, tubercolosi e 42
nazismo, tubercolosi e 42
NCCLS, vedi CLSI
ndh 242, 243
necrosi caseosa 67-71, 106, 374
necrotico-purulento, materiale 126, 128, 131, 142, 268, 389
Neelsen, Friedrich 24
neoplasie 96, 101, 323, 327, 403
NEQAS (UK National External Quality Assessment Service for Microbiology) 148, 174, 275
neurite ottica 81
next generation sequencing 57, 252
NHS (*National Health System*) 276
Niacin test strips 191
niacina
attività antitubercolare 45
test di produzione della 187, 191, 376-378, 417
nitrati, test di riduzione dei 94, 187, 191, 192, 376, 377, 378, 417
Nocard, Edmond 34
Nocardia 53, 146, 148
Nocardia mediterranei 46
nodulari, lesioni da micobatteri 15, 72, 73, 91, 92, 95, 96, 98, 100, 101, 104-106, 125, 369, 370
non cromogeni, micobatteri 91, 97, 190, 191, 235
non pigmentati, micobatteri 91, 97, 190, 191, 235
Non Visible Lesions, vedi NVL
notifica di casi tubercolosi 40, 64, 65, 66
NTM (*Non Tuberculous Mycobacteria*), vedi MNT
Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, vedi NASBA
NVL (*Non Visible Lesions*) 372, 374

O

OADC, arricchimento 165-168, 216, 218, 221, 223, 228-232
 Odissea 8
Officially Tuberculosis Free (OTF) 371
 ofloxacina 213-215, 223, 227, 251, 397, 398
 OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) 26, 63-65, 79, 105, 214, 215, 223, 227, 242, 248, 273, 396, 398, 405
 Organizzazione Mondiale della Sanità, vedi OMS
 Orwell, George 44
 ospedalizzazione per tubercolosi 80, 81
 ossido di etilene 350
 osteo-articolari, infezioni
 da MNT 106, 107
 tubercolari 3-6, 11, 15, 30, 68-70, 74, 80, 126, 371, vedi anche morbo di Pott
 osteo-midollare, biopsia od aspirato 108, 378
 osteomielite 106, 107 vedi anche osteo-articolari, infezioni
 ostruttivo, patologia polmonare di tipo 90
 OTF (*Officially Tuberculosis Free*) 371
outbreak di MNT 106
oxyR 242

P

PACT, supplemento 163
 paleomicrobiologia 4, 5
 paleopatologia 4
 PANTA, miscela di antibiotici 165, 167, 168, 172
 PANTA/F 172
 Paolo di Egina 12
 Paracelso 13
 paracentesi 75
 paraffina 32, 128, 129, 374, 389
 paratubercolosi 110
 parete micobatterica 4, 5, 43, 44, 53, 57, 70, 141, 146, 187, 192-195, 241, 247, 385, 395, 397
 Parola, Luigi 17
pAS 44-46, 214, 215, 223, 398
 Pasteur, Louis 33, 34, 43
 pasteurizzazione del latte 68, 369
 PCC (*Probe Check Control*) 274
 PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 187, 197, 200, 201, 203-205, 248, 249, 263-267, 270-272, 275, 292, 297, 299, 302, 303, 305, 373, 378-380, 394

PCR *multiplex*, vedi *multiplex*, *triplex*, *quadraplex*
 PCR *restriction analysis*, vedi PRA
pectus excavatum 90
 pediatrici, pazienti 89, 102, 103, 125, 132, 175, 274, 387
 penna, test della 76, 321
 peptidi ciclici 245, 247, 251
 pericardico, liquido 69, 75, 126, 128, 130, 389
 pericardite tubercolare 69, 75, 126
 peritoneale, liquido 128, 130, 370, 389
 peritonite tubercolare 75, 371
 permanganato di potassio 144, 350
 perossido di idrogeno 350, 351
 Petraggiani, Giovanni 34
 Petraggiani, terreno di 34, 162
 Petroff, metodo di decontaminazione di 158
pft 8
phthisis 8
Phthisis 8
phthisie 8
 piastra riscaldante 142
 Pidoux, Hermann 22, 23, 27
 pigmentati, micobatteri 94, 99, 190, 191, 232
 pigmentazione delle colonie micobatteriche 54, 57, 89, 99, 105, 187, 190, 191
 pigmento, produzione di, vedi pigmentazione
 piombaggio extrapleurico muscolo-periosteale 32
 Piorry, Pierre Adolphe 30
 pirazinamidasi 244, 247
 pirazinamide 45, 79, 80, 81, 96, 97, 100, 213, 215, 216, 222, 223, 225-227, 242, 244, 245, 247, 253, 398, 399, 401
 Pirazinamide *kit*, MGIT 222
 pirazinamide-resistenza, base molecolare 244
 piruvato 162, 376
 piuria 71, 74, 131
 Platone 8
 Plessis, Rose Alphonsine 20
 pleurico, liquido 74, 125, 126, 128, 130, 277, 389
 pleurico, versamento 30, 74, 125
 pleurite tubercolare 74, 126, 128, 130, 389
 pleurolisi intrapleurica 32
pncA 242, 244, 253
 pneumoconiosi 90
 pneumopatia bollosa 90

- pneumopatia cronica 90, 92, 94
 pneumotorace 30-32, 38
 pneumotorace extrapleurico 32
 polifenoli 350
 polimerasi 130, 204, 205, 241, 247, 263, 264, 266, 269, 270, 278, 299, 303, 305
 polimixina B 163, 165, 166, 168, 170-172
 polimorfismo genico 289, 291, 297, 303, 309, 378
 politica sanitaria di controllo 16, 28, 29, 63, 364
 politica, tubercolosi e 27
 polmonari, infezioni da MNT 90-102
 criteri diagnostici 91
 MNT a lenta crescita 91-101
 MNT a rapida crescita 101, 102
 polmonite allergica 93
Polymerase Chain Reaction, vedi PCR
 porta virtuale 348, 349
 Portal, Antoine 15
 post-primaria, tubercolosi 69-71, 370
 Potain, Claude 30
Potentially Pathogenic Environmental Mycobacteria, vedi PPEM
 potenza di un farmaco 214
 Pott, morbo di 3-5, 11, 15, 74, vedi anche spondilodiscite; osteoarticolari, infezioni
 Pott, Sir Percivall 15
 PPD 26, 76, 321-323, 402, vedi anche tubercolina
 PPEM (*Potentially Pathogenic Environmental Mycobacteria*) 53, vedi MNT
 PRA (PCR Restriction Analysis) 187, 203, 204
 predisponenti, condizioni, ad infezioni da MNT 89, 90, 92, 100, 106, 386
 preistoria, tubercolosi nella 3, 5, 6
 pressione negativa in laboratorio di micobatteriologia 80, 340, 345-348, 357
 pressometrico, rilevamento 167, 170
 prevenzione di
 rischi sul luogo di lavoro 339, 357
 cross-contaminazioni 178
 resistenze 64
 tubercolosi 15, 16, 22, 28, 36, 39, 80, 355, 361
 prima linea (scelta), farmaci di 77, 96, 213, 214, 222-227, 356, 358, 363, 398, 399, 405
 prima scelta, farmaci di, vedi prima linea
 primaria, tubercolosi 68, 71, 72, 370
 primer 197, 200, 201, 204, 205, 248, 249, 253, 263, 264-266, 269-271, 273, 292, 293, 297-300, 302, 303, 305, 378-380
 evidenziazione di farmaco-resistenza 253
 identificazione di tubercolosi bovina 378-380
 MIRU-VNTR 24 299, 300
 PRA, PCR Restriction Analysis 204
 RFLP di IS6110 per identificazione di tubercolosi bovina 380
Spoligotyping 304
 probabilità pre-test di
 micobatteriosi/tubercolosi 125
 tubercolosi MDR 254
Probe Check Control (PCC) 274
ProbeTec ET Mycobacterium tuberculosis complex 268
proficiency, vedi qualità
 profilassi 109, 229, 361, 374, 387, 400
 chemioprolifassi, vedi terapia dell'infezione tubercolare latente
 immunoprofilassi, vedi vaccinazione
 promizolo 43
 prontossil 45
 proporzioni, metodo delle, per ABG per MTC 214, 216, 222, 223, 273, 356
 prostatite 74
 proteasi, inibitori delle 78, 81, 230, 400, vedi anche antiretrovirale, terapia
 proteina da shock termico 264
 protezione individuale, dispositivi di 126, 342, 357, 358
 protezione dal rischio biologico 80, 126, 241, 339, 341, 342, 344, 357, 358, 363
 protonamide 45, 215
Pseudomonas aeruginosa, ATCC 27853 236
Pseudomonas aeruginosa, decontaminazione da 159, 160
 puntura lombare 75
 purezza di un farmaco 214
Purified Proteic Derivative, vedi PPD
 purulenti, materiali, vedi necrotico-purulento, materiale
 pus, vedi necrotico-purulento, materiale
 Pvull, enzima 290, 292, 294
- ## Q
- QC (*Quality Control for Molecular Diagnostics*) 275
 QIAmp DNA Minikit 270
quadruplex, PCR 297, 302
 qualità, controllo di (*proficiency*) 147, 148, 157, 164, 166, 173, 177, 192, 197, 200-204, 208, 226, 229, 230, 234, 236, 268-272, 274, 275, 330, 358, 359, 362, 363
 qualità, valutazione esterna di 173, 148, 208, 226, 275, 363

- qualitativi, metodi per ABG 213
Quality Control for Molecular Diagnostics (QC) 275
 QuantiFERON-TB Gold 76, 324-330, 332, 404, vedi IGRA
 quantitativi, metodi per ABG 213
quencher 266, 267
- R**
- raccolta del campione biologico 125-129, 131-133, 135, 137, 279, 329, 373, 386-388, 393
 Rachel 19
 radiazioni
 ionizzanti 350
 ultraviolette 350
 radiologico, esame 4, 29, 30, 72-74, 81, 92, 97, 102, 126, 323, 387, 403
 radiometrico, sistema colturale 166
 Ramazzini, Bernardino 13
 Ranke, complesso primario di 68
 Ranke, Karl Ernst 30
 RAO (Ricambi Aria per Ora) 346
 rapida crescita, micobatteri a, vedi crescita rapida, micobatteri a
 rapporto di resistenza (*resistance-ratio*), metodo di, per ABG per MTC 214
 Rasmussen, aneurisma di 70, 71
 Ravenel 28
 RD-1 (*Region of Difference 1*) 200, 323
 rDNA 16S 56, 89, 100, 205, 206, 264
 RealArt *Mycobacterium tuberculosis* TM PCR kit 270
Real-Time PCR, vedi RT-PCR
 reazioni avverse ai farmaci antitubercolari 81
 recidiva di malattia da micobatteri 44, 45, 79, 92, 97, 99, 102, 106, 229, 280, 289, 311, 400
reference strain 207, 208
 refertazione
 amplificazione genica da campione 279
 esame colturale 178, 179, 393
 esame microscopico 149, 150, 385, 391
 tempo ottimale di 356, 362, 398, 405
 test IGRA 332
Region of Difference 1, vedi RD-1
 regioni conservate del genoma, vedi conservate, regioni
 regioni variabili del genoma, vedi variabili, regioni
 Regolamento di Polizia Veterinaria 29, 371
 reinfezione esogena 69, 93, 289, 311, 313, 370
Relative Light Unit (RLU) 268
 renale, tubercolosi 69, 71, 72, 74
 resa diagnostica dei test microbiologici 125, 127, 129, 130
resistance-ratio, metodo di 214
 resistenza ai farmaci, vedi farmaco-resistenza
Restriction Fragment Length Polymorphism, vedi RFLP
 restrittivo, patologia polmonare di tipo 90
 restrizione, enzima di 203, 204, 265, 269, 292, 378
 restrizione, sito di 265, 290
 rete dei laboratori, vedi laboratorio di micobatteriologia
 Rete Regionale dei Laboratori, vedi RRL
 reversioni nei test IGRA 326, 332
 RFLP-IS6110 289-297, 304, 309, 310, 312, 378, 379
 genotipizzazione di *Mycobacterium bovis* 291, 378, 379
 interpretazione del profilo 296
 potere discriminante 290
 protocollo operativo 291-296
 riproducibilità 290
 Rhazes 10
 Rhodococcus 53, 146, 385
 riattivazione endogena 68-70, 72, 81, 289, 310, 311, 321
 Ricambi Aria per Ora (RAO) 346
 ricambi di aria in laboratorio di micobatteriologia 345, 346
 ridecontaminazione delle colture, vedi decontaminazione
 RIDOM 206
 rifabutina 93, 98, 102, 109, 214, 215, 223, 228, 230-232, 247, 398, 400, 401
 rifamicina 46, 93, 102, 109, 247
 rifampicina 46, 64, 78-81, 93-100, 102, 104, 105, 213, 215, 219, 221-223, 226, 228, 230-232, 241, 242, 247, 248, 250, 253, 273, 275, 397-401
 rifampicino-resistenza, basi molecolari 96, 242, 243, 247, 250, 273
 rifapentina 79, 247
 Riferimento, centro/laboratorio/struttura di 79, 187, 214, 226, 227, 232, 291, 361, 362, 386, 398
 riordino dei laboratori, vedi laboratorio di micobatteriologia
 ripetute, sequenze, vedi *tandem repeat*
 rischio biologico in laboratorio di micobatteriologia, vedi agenti biologici
 risonanza magnetica nucleare 74, 75, 126
 risposta immunitaria di tipo cellulo-mediato, vedi cellulo-mediata, risposta immunitaria
RLU (Relative Light Unit) 268
 RMN, vedi risonanza magnetica nucleare

RNA-polimerasi 241, 263, 264, vedi anche polimerasi
 RNasi 263, 264
 Rockefeller, fondazione 40
 rodamina 141, 144, 145, vedi anche auramina
 Roentgen, Wilhelm 29
 romana, tubercolosi nell'antica cultura 9
 romanticismo, tubercolosi e 18
 Rosenkranz, Karl 19
rpoB 56, 101, 205, 241-243, 247-250, 253, 273, 399
rpoB e tassonomia 56
rpsA 244, 245
rpsL 242, 245, 253
 RRL (Rete Regionale dei Laboratori) 360, 361
 rRNA 16S 55, 56, 99, 196, 201, 205, 245, 246, 263, 267, 270, 377
 rRNA 23S 197, 200, 201, 229, 249, 269
rrs 242, 245, 251-253
 RT-PCR (*Real-Time* PCR) 265, 266, 270-272, 275
 Ruffer, Sir Marc Armand 4
 Runyon, classificazione di 57, 89
 rutenio, sali di 165, 167, 172

S

salernitana, Scuola 11, 12
 saliva 70, 127-129, 387, 388
 Salvioi, Gaetano 34
Sample Reagent 273
 San Gervasio 11
 San Marcolfo 12
 San Medardo 11
 Sanatoriale, Villaggio Morelli 37, 38
 sanatorio 19, 35-37, 39, 40, 45, 46
 Sand, George 18
 sangue 7-9, 16, 17, 19, 22, 42, 105, 108, 110, 126, 129, 131, 132, 141, 155, 165, 169, 170, 172, 174-177, 197, 233, 324, 328-332, 345, 386, 387, 389, 390, 401, 404
 mestruale 129, 155, 174, 387, 389
 periferico, indicazioni e modalità di prelievo, vedi emocultura
 saponina 175, 177
 Sauerbruch, Ferdinand 32
 Saugman, Christian 31
 Schatz, Albert 44
 Schmidt, Elliot 4

Schoenlein, Johann Lukas 21
Schwindsucht 8
 Sciascia, Antonino 38
 scoliosi 90
 scotocromogeni, micobatteri 99, 190, 191
 scrofolo 11, 12, 14, 21, 28, vedi anche linfadenopatia
 Scuola salernitana 11, 12
 SDA (*Standard Displacement Amplification*) 265, 269
 SDS (laurilsolfato di sodio) 291, 306-308, 375
 seconda linea (scelta), farmaci di 64, 231, 214, 223, 227, 241, 242, 245, 246, 251, 252, 356, 359, 363, 397, 398, 399, 405
 seconda scelta, farmaci di, vedi seconda linea
 Seibert, Florence 26
 selettivo, terreno, vedi terreno di coltura
 selvaggio (*wild-type*), ceppo 213, 229, 230, 248-251, 273
 Semb, Carl 33
 Sensi, Pietro 46
 sensibilità, test di, vedi antibiogramma colturale e molecolare
 Sensiron, Gilbert 41
Sensititre, sistema per ABG 227, 228, 233, 234
 sepsi 107, 110, 174
 sequenza di inserzione 6110, vedi IS6110
 sequenza DR (*Direct Repeat*), vedi DR
 sequenze ripetute, vedi *tandem repeat*
 sequenze spaziatrici, vedi *spacer*
 sequenziamento genico 56, 57, 97, 100, 101, 107, 187, 204-206, 208, 248, 252, 253, 297, 309, 356, 363
sequevar 57, 201, 202
 sessualità, tubercolosi e 8
 Shakespeare, William 11
 Sherlock *Mycobacteria*, MIDI 192
short course, terapia 46, 96
 sicurezza sul lavoro 142, 145, 149, 176, 291, 339-341, 343, 345, 347, 349, 351, 357-360, 362, 364, 390
 legislazione 339, 340, 357, 362
 livello di biosicurezza 226, 291, 340, 344, 357, 358, 363
 Signora delle camelie, la 20
 Silvius 14, 21
 Simon, focolai di 68, 69
 sindrome di *Lady Windermere* 92-94
 sinoviale, liquido 130
 sinovite 107

- sistema nervoso centrale 70, 75, 126, 371
- sito di restrizione 265, 290
- Smith, Theobald 28
- SNP (polimorfismi di singoli nucleotidi) 309
- Società italiane di pneumologia 324
- sonda 99-101, 196-202, 248-252, 265-267, 269-271, 273, 290-293, 295, 304, 306, 380
- sonicazione 267, 268, 278, 344
- sorveglianza
 sanitaria 28, 343
 epidemiologica 28, 65, 66, 227, 310, 343, 355, 360, 361, 363
- sospetto clinico di tubercolosi 130, 178, 276, 277, 278, 279, 280, 327, 328, 386, 387, 392, 394
- Southern Blot* 290, 292, 294
- spacer 56, 201, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309
- Spacer Oligonucleotide Typing*, vedi *Spoligotyping*
- spaziatori, vedi *spacer*
- spaziatrici, sequenze vedi *spacer*
- sazzolatura bronchiale 128, 130, 155, 388
- specie micobatteriche 3, 53-58, 63, 89, 90, 104, 147, 148, 162, 164, 165, 178, 187-208, 269, 304, 308-310, 385-386, 391, 392, 397, 399, 400
 a lenta crescita, vedi *lenta crescita*
 a rapida crescita, vedi *rapida crescita*
 di MNT, vedi *MNT*
 elenco specie 188-190
 identificazione 187-208
 nell'ambito di MTC 63, 304, 308-310
 significatività clinica 90
Spoligotyping 304, 308-310
 tassonomia 53-59, 99, 101
- spedizione e trasporto dei campioni 132, 133, 387, 388
- Spigelius, Adriann van der Spiegel 13
- splenomegalia 73, 108
- spoligotipo 5, 6, 304, 308, 309, 313
- Spoligotyping* 4, 252, 303-311, 378, 379
 codice binario 307, 308
 codice ottale 307, 308
 e specie di MTC 304
 interpretazione 307
 potere discriminatorio 304
 protocollo di 305
 rappresentazione grafica 307, 308
- spondilodiscite 3-5, 11, 15, 74, 107, vedi anche *Pott*, morbo di
- SPS (*Sample Processing Control*) 274
- SPS (sodio polianethol sulfonato) 174-176
- Standard Displacement Amplification*, vedi *SDA*
- standard per laboratori di micobatteriologia, vedi laboratorio di micobatteriologia
- Staphylococcus aureus*, ATCC 29213 236
- Stark, William 14, 15
- sterilizzazione 345, 349-351
 fisica 349, 350
 chimica 350, 351
- Stonebrink, terreno di 376
- storia della tubercolosi 3-46
 batteriologia 23-25
 capsule eburnee 11
 chemioterapia 43-46
 chirurgia 32, 33
 clinica 20, 21
 epidemia 26
 ereditarietà, teoria della 9, 13-16, 18, 21, 27
 intuizione di Fracastoro 13, 14
 medicina araba 9, 10
 morbo regio 11-13
 natura della malattia 18, 22
 organizzazioni antitubercolari 40, 41
 origine 3
 percezione della malattia 41, 42
 pneumotorace 30, 31
 politica 27, 28
 popoli antichi 6-8
 preistoria 3, 4
 primi provvedimenti 15, 16
 radiologia 29
 reperti paleologici 4-6
 romanticismo 18-20
 sanatori 35-40
 scuola salernitana 11
 tisi 8, 9
 trasmissibilità 22, 23
 tubercolina 25, 26
 tubercolo 14, 15
 tubercolosi bovina 28, 29
 vaccino 33-35
 vampirismo 16-18
- strategia per controllo di LTBI e tubercolosi 63, 64, 77, 82, 310, 324
- streptomina 43-46, 79, 81, 93, 95, 97-99, 105, 213, 215, 219, 221, 222, 227, 228, 231, 242, 245-247, 253, 398, 399, 401
- streptomina-resistenza 247
- Streptomyces* 43, 46, 53
- Streptomyces mediterranei* 46
- string test* 130
- striscio del vetrino, vedi *vetrino*

Stuertz 32

sudorazione notturna 71, 73, 92, 96, 100, 125

sulfametossazolo, vedi trimetoprim/sulfametossazolo

sulfonamidi 44, 102, 106, 229, 234

Supplement/F 172

Supplemento MGIT, vedi OADC

SYBR *green* 266

Sydenham, Thomas 13

T

tabagismo (fumo) 90, 97, 99, 341, 324

TAC 4, 73, 74, 75, 125, 126

tamponi, raccolta mediante 127, 128, 131, 132, 342, 387, 389

tandem repeat 297, 301, 303

Taq polimerasi 130, 204, 266, 270, 299, 303, 305, vedi anche polimerasi

TaqMan 266, 267, 270, 271, 273, 274, 380

tasso di mortalità per tubercolosi 63, 65

tassonomia dei micobatteri 53-59, 99, 101

TB eXIST 223, 224

TbI 45

TB7.7 324, 328, 329

TBCentro (Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi da *Mycobacterium bovis*) 372, 373

TBNET 326

TCH (idrazide dell'acido 2-tiofen-carbossilico) 376-378

TDM (trealoso 6,6' dimicolato) 70

tellurito, test 377

temperatura di crescita dei micobatteri 54, 98, 104, 164, 169, 231, 376

tempo di refertazione, vedi refertazione

tenosinovite 106, 107

terapia

chirurgica, vedi chirurgica, terapia

dei MNT, vedi MNT 90-110, 229, 230-233, 400, 401

della tubercolosi 79-81, 231, 241, 242, 289

dell'infezione tubercolare latente 77-79, 321, 324-326, 332

DOT (*Directly Observed Therapy*) 63, 78, 79

DOTS (*Directly Observed Therapy Short-course*) 63, 64

e test IGRA 327, 328, 404

e inquadramento tassonomico 57, 187

e test di amplificazione 280

monitoraggio (follow-up) 65, 66, 81, 94, 127, 179, 280, 327, 328, 355, 387, 390, 393, 395, 404, 405

preventiva, vedi profilassi

storia 6, 8, 10-12, 17, 18, 25, 30-33, 38, 39, 41, 43-46

terminator, nucleotide 204-206

termo-tolleranti, micobatteri 55, 56

terreno di coltura

a base di agar 24, 162-164, 218, 219-221, 223, 414 (vedi Middlebrook 7H10 e 7H11)

all'uovo 103, 162-164, 216, 217, 220, 414

ATS (American Thoracic Society) *medium* 162

Coletsos 162, 376

con fattori di crescita 163

di Gruft 163

di Mitchison 163

di trasporto 128, 131, 132, 387, 389

Gottsacker 162

IUTM (*International Union Tuberculosis Medium*) 162

liquido 96-98, 108, 131, 148, 157, 161, 162, 164, 165, 175, 179, 197, 218, 244, 356, 363, 372, 376, 385, 392, 393, 398, 413

Löwenstein-Jensen 162, 163, 190, 191, 215, 216, 220, 221, 376, 377

Löwenstein-Jensen con PACT 163

Löwenstein-Jensen selettivo 163

Middlebrook 7H12 167

Middlebrook 7H10 161, 163, 164, 190, 215-221, 223, 376, 377

Middlebrook 7H11 161, 163, 164, 190, 215, 216

Middlebrook 7H9 155, 163, 165, 167, 169, 170, 172, 175, 176, 216, 218, 219, 226, 376, 377

Petragnani 34, 162

selettivo 162-164

territorio ufficialmente indenne da tubercolosi 371

tessuti molli, infezioni da micobatteri 89, 99, 104, 105, 401

test biochimico-colturali, vedi biochimico-colturali test

test della penna 76, 321

test di amplificazione diretta (DAT), vedi amplificazione

tetrazolio, sale di 166

Thin Layer Chromatography (TLC) 194

Thoreau, David Henry 20

threshold cycle (C_T) 265, 273

Timbal, Maria Teresa 46

Time of Flight, vedi ToF

Tyndall 43

tiocarlide 45

tiosemicarbazoni 45

tipizzazione molecolare, vedi molecolare, epidemiologia

tisi 3, 7-11, 13-22, 28, 36, 41, 42

TLC (*Thin Layer Chromatography*) 194

- tlyA 242, 245
TMA (*Transcription Mediated Amplification*) 263, 264
TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) 109, 325
tobramicina 101, 106, 233, 235, 236, 401
tocco reale 11, 12
ToF (*Time of Flight*) 195, 196
tomografia computerizzata 4, 73-75, 125, 126
topoisomerasi 246
toracentesi 74
toracoplastica 32, 33
tosse 7, 19, 20, 31, 71, 73, 75, 81, 90, 92, 95-101, 125, 127, 340
Toussaint 30
transcriptasi inversa 263, 264
Transcription Mediated Amplification (TMA) 263, 267
Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction (TRC) 275
trans-tracheale, aspirato, vedi aspirato
trans-traduzione 244
trapianto 77, 105, 107, 109, 110, 236, 323, 403
trasmissione della tubercolosi 13, 17, 28, 67, 80, 129, 289, 310, 312, 313, 340, 341, 358, 369, 371, 386, 390, 398
trasporto dei campioni biologici 125, 127, 129, 132, 133, 135, 137, 164, 348, 372, 373, 386, 388
trattamento, vedi terapia e profilassi
trauma 89, 104-107
Traviata, la 20
TRC (*Transcription-Reverse Transcription Concerted Reaction*) 275
trealoso 6,6' dimicolato (TDM) 70
trimetoprim 163, 165, 166, 168, 170, 172
trimetoprim/sulfametossazolo (cotrimossazolo) 95, 100, 104, 228, 231-233, 235, 236, 401
triplex, PCR 297, 299, 302, 303
Trudeau, Edward Livingston 37
T-SPOT.TB 76, 324-328, 330, 332, 404
TST, vedi Mantoux
Tsakumurella 53, 146
tubercolo, vedi granuloma
tubercolina 25, 26, 28, 29, 33, 44, 76, 321, 326, vedi anche PPD e Mantoux
tubercoloma 75, 126
tubercolosi
addominale 75
aperta (bacillifera) 70, 77, 396, 404
attiva 71-73, 77, 98, 321, 323-328, 395, 396, 402-404
bovina 28, 29, 68, 369-375, 377, 379, vedi bovina, tubercolosi
criptica disseminata 69
disseminata 69, 71-73, 75, 126, 132, 241, 370, 371, 386, 387
encefalica 70, 75, 126, 371
epidemiologia molecolare 289-315, 317, 363
epidemiologia tradizionale 22, 23, 89, 95, 99, 248, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309-313, 315, 317, 363
extrapolmonare 73, 80, 126, 328, 332
genito-urinaria 74
gruppi a rischio 64, 254
iconografia 4, 71
istopatologia 67-71
latente, vedi infezione tubercolare latente
linfonodale, vedi linfadenopatia
management 80, 81
meningea 6, 14, 44, 69, 72, 75, 80, 126, 371
miliare 14, 15, 21, 35, 69, 70, 73, 80, 126, 131, 174, 371, 386, 387
origine 3
osteo-articolare 3-6, 11, 15, 30, 68-70, 74, 80, 126, 371
pericardica 69, 75, 126
peritoneale 75, 371
pleurica 74, 126, 128, 130, 389
polmonare 44, 65, 71, 72, 74, 80, 81, 92, 130-132, 276, 277, 279
post-primaria 69-71, 370
primaria 68, 71, 72, 370
programmi di controllo 289, 312
radiologia 4, 29, 30, 72-74, 81, 92, 97, 102, 126, 323, 387, 403
storia, vedi storia della tubercolosi
terapia 79-81, 231, 241, 242, 289
Tuberculosis Skin Test, vedi Mantoux
tumor necrosis factor- α , vedi TNF- α
turnaround time, vedi refertazione, tempo di
Tween 80 94, 165, 172, 175
type strain 207, 208
- U**
UK National External Quality Assessment Service for Microbiology, vedi NEQAS
ulcera del Buruli 105
ulcera, raccolta del campione 126, 132
umorale, risposta immunitaria 405
uptake dei farmaci 246, 247
uracile-N-glicosilasi (AmpErase) 271

ureasi, test 376, 378
 urina 74, 126, 129, 131, 155, 156, 159, 273, 277, 388, 389
 urine delle 24 ore 129, 389
 urografia 126
 UV (radiazioni ultraviolette) 295, 350

V

vaccinazione 33-35, 80, 343, 358
 vaccino 26, 33-35, 42
 valori predittivi positivo e negativo, in test 248, 252, 332
 Valsalva, Antonio Maria 14
 vampirismo 16-18
 van Leeuwenhoek, Antoni 18
 vancomicina 161, 170, 171
 variabili, regioni del genoma 32, 53, 54, 73, 312, 369, 394
 Variable Number Tandem Repeat, vedi VNTR
 velocità di crescita dei micobatteri 54, 57, 89, 187, 190, 376, 385
 ventilazione nel laboratorio di micobatteriologia 345, 346
 verde di malachite 162-164, 216
 Verdi, Giuseppe 20
 versamento pleurico 30, 74, 125
 VersaTREK Culture System II 170, 171
 VersaTREK Myco AS 171
 VersaTREK Myco Culture bottle 222
 VersaTREK Myco GS 171, 222
 VersaTREK Myco PVNA 171
 VersaTREK Myco Susceptibility kit 222
 VersaTREK, sistema automatico 167, 170, 171, 215, 222
 Vesalio 14
 veterinaria 5, 29, 34, 371, 372
 vetrino
 colorazione 23-26, 142-147, vedi anche colorazione del vetrino
 fissazione 142, 147, 343
 striscio 141, 142, 147, 156, 341
 Villaggio Sanatoriale Morelli 37, 38
 Villemin, Jean Antoine 22, 23, 26, 28, 43
 viomicina 242, 245, 251, 253
 Virchow, Rudolf 21, 25, 28

virtuale, porta 348, 349
 VNTR 24, vedi MIRU-VNTR 24
 VNTR ECDC 0002, genotipo 313
 VNTR, vedi MIRU-VNTR
 von Baumgarten, Paul Clemens 23
 von Behring, Emil 25
 von Pannwitz, Gottfried 41
 von Pirchet, Clemens Peter 25, 26
 von Rokitsansky, Karl 21, 22

W

Waksman, Selman Abraham 43-45, 46
 Walter 45
 Whytt, Robert 14
 wild-type (selvaggio), ceppo 213, 229, 230, 248-251, 273
 wild-type, sequenza 248-251, 273, vedi anche wild-type, ceppo
 Willis, Thomas 14

X

XDR (extensive drug resistance) 64, 66, 213, 241, 252, 254, 313, 397, 399
 Xpert MTB/RIF 242, 248, 253, 272-274

Y

yang 6, 271
 yin 6, 7
 Young, Thomas 20

Z

Ziehl, Franz 24
 Ziehl-Neelsen, colorazione di 24, 68, 142, 143, 373, 413
 zona filtro in laboratorio di micobatteriologia 276, 345
 Zorini, Attilio Omodeo 32
 Zubiani, Eusonio 37