

ESAME CULTURALE DELL'ESCREATO PER LA RICERCA DEI MICOBATTERI: CONFRONTO DI DUE METODICHE

E. TORTOLI, M.T. SIMONETTI

Laboratorio di Batteriologia e Virologia, USL 10/D, Firenze

RIASSUNTO

Sono state confrontate due differenti metodiche di decontaminazione (Bactofen e Nekal BX) per la ricerca culturale dei micobatteri nell'escreato.

Sono state valutate: a) la lesività delle due sostanze nei confronti di 10 sospensioni di micobatteri; b) la loro efficacia decontaminante su 51 escreti contenenti alte cariche microbiche non specifiche; c) il loro impiego routinario su 105 escreti selezionati per precedenti positività.

Entrambi i decontaminanti hanno dato buoni risultati: il Bactofen si fa preferire per la ridottissima lesività mentre il Nekal BX rende minima la perdita di positività in seguito ad inquinamento.

INTRODUZIONE

La convinzione largamente diffusa che, in seguito all'avvento della chemio-antibiotico terapia antitubercolare, la tubercolosi fosse destinata a perdere rapidamente il suo "status" di malattia sociale si è rivelata in questi ultimi anni priva di fondamento.

Se da un lato è infatti vero che la mortalità conseguente a tubercolosi è in diminuzione essa rimane tuttavia ancora oggi, almeno in Italia, la più elevata nell'ambito delle malattie infettive (1).

Per quanto riguarda poi la morbosità non sono disponibili nel nostro Paese dati attendibili ma, soprattutto in questi ultimi anni, la tendenza al rialzo pare aver preso il sopravvento.

Un capitolo a parte è poi costituito dalle infezioni da micobatteri, tubercolari e non, che con sempre maggior frequenza vengono diagnosticate fra gli individui immunodepressi e fra i malati di AIDS in particolare.

La lentezza di crescita caratteristica della quasi totalità delle specie di micobatteri di interesse clinico fa sì che il relativo esame culturale abbia

SUMMARY

Two different decontaminating methods for the culture of mycobacteri in the sputum have been compared.

The two substances (Bactofen and Nekal BX) have been valued with reference to: i) their lesivity on 10 suspensios of mycobacteria; ii) their decontaminating activity on 51 sputa containing abundant non-tubercular flora; iii) their routinary use on 105 sputa selected on the grounds of former positivities.

Both decontaminants turned out to be effective: Bactofen shoved to have a very small lesivity; Nekal BX cut down the loss of positivities because of contaminations.

caratteristiche sue proprie che non trovano riscontro in altri settori della batteriologia. Il punto cruciale è rappresentato dal trattamento decontaminante indispensabile per eliminare dal campione in esame la flora batterica "associata" agli eventuali micobatteri, flora che altrimenti, sviluppandosi rapidamente, determinerebbe l'inquinamento del terreno di coltura impedendo lo sviluppo dei germi oggetto della ricerca.

Svariate sono le metodiche che, da un secolo a questa parte, sono state proposte, tendenti tutte al raggiungimento del delicato e forse inafferrabile equilibrio fra azione decontaminante, sulla flora associata, ed assenza di lesività nei confronti dei micobatteri.

La recente (almeno per l'Italia) introduzione in commercio di un nuovo decontaminante (Nekal BX Biotest) si rifà alle normative emanate dal Ministero della Sanità della Repubblica Federale Tedesca (3-7), ci ha stimolato a confrontarne la validità in rapporto alla metodica introdotta, con risultati soddisfacenti, ormai da diversi anni nella routine del nostro laboratorio.

Specie isolate	N° Isolamenti totali	sui campioni inquinati		% Inquinamenti in rapporto alla presenza dei singoli stipti			
		A	B	A	B	A	B
Stafilococco coag. neg.	14	2°	1°	14.3	(7.1)	11.0	(0)
Pseudomonas aeruginosa	13	6	1	46.1		7.7	
Candida albicans	13	3°°	-	23.1	(7.7)	-	
Staphylococcus aureus	9	2	-	22.2		-	
Enterobacter cloacae	7	-	-	-		-	
Candida sp.	6	1	-	16.7		-	
Escherichia coli	5	1	-	20.0		-	
Proteus mirabilis	4	1°	1°	25.0	(0)	25.0	(0)
Acinetobacter anitratus	3	-	-	-		-	
Klebsiella oxitoca	3	-	-	-		-	
Klebsiella pneumoniae	3	2°	-	66.7	(33.3)	-	
Aspergillus fumigatus	2	-	-	-		-	
Candida glabrata	1	1	-	100.0		-	
Candida krusei	1	-	-	-		-	
Enterobacter aerogenes	1	-	-	-		-	
Citrobacter freundii	1	-	-	-		-	
Hafnia alvei	1	-	-	-		-	
Achromobacter xylosoxidans	1	-	-	-		-	
Haemophilus influenzae	1	-	-	-		-	
Citrobacter diversus	1	-	-	-		-	
Candida parapsilosis	1	-	-	-		-	
Pseudomonas maltophilia	1	-	-	-		-	

Tabella 1. Flora microbica presente nei 51 escreti utilizzati per il rilevamento dell'efficacia decontaminante. A= campioni trattati con Sputasol e Bactofen; B= campioni trattati con Nekal BX; °=casi in cui lo stipte in questione é associato a Ps. aeruginosa; (=) le % fra parentesi sono state ottenute non considerando i casi lo stipte in questione era associato a Ps. aeruginosa.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione, condotta fra il novembre 1987 e il febbraio 1988 si é articolata su 3 diverse fasi prendendo in esame: eventuale azione lesiva nei confronti dei micobatteri, efficacia della decontaminazione, praticabilità dell'applicazione routinaria.

Per le prove di lesività sono stati impiegati n° 10 stipti di micobatteri (9 tubercolari ed 1 M. xenopi) isolati da altrettanti ammalati ricoverati presso l'Ospedale della USL 10/D.

Per le prove di decontaminazione sono stati

utilizzati n° 51 escreti provenienti da pazienti "non specifici" ricoverati nei vari reparti della USL suddetta. Tali escreti sono stati selezionati fra quelli contenenti flora batterica e micetica a cariche elevate, con particolare riferimento a quelle specie che rappresentano i più frequenti agenti inquinanti delle colture per micobatteri (vedi Tabella 1).

Per la valutazione nella routine sono stati impiegati n°105 escreti provenienti da pazienti ricoverati nei Reparti del Dipartimento di Pneumologia della medesima USL, selezionati in base a precedenti di positività dell'esame batteri-

	A		B	
	crescita ≥ controlli	crescita < controlli	crescita ≥ controlli	crescita < controlli
Sospensione madre	10	0	10	0
Sospensione 10 ⁻³	8	2	4	6
Sospensione 10 ⁻⁵	9	1	7	3

Tabella 2. Confronto tra la crescita ottenuta da sospensioni micobatteriche standardizzate trattate con i due decontaminanti (A= Bactofen; B= Nekal BX) in rapporto a quella di equivalenti sospensioni non trattate.

scopico e/o colturale per bacillo di Koch (n° 100) o per micobatteri non tubercolari (n°5).

La decontaminazione impiegata di routine nel nostro Laboratorio, già descritta e valutata in precedenza (2-4-5-6), impiega cloruro di dodecil-di (beta-ossietil)-benzilammonio (Bactofen-Geigy) allo 0,2% in tampone fosfato a pH 7 da aggiungere in parti uguali al materiale patologico per un tempo di contatto di 2h a 37°C, prima della semina. Negli escreti tale trattamento è preceduto dalla fluidificazione mediante aggiunta di ditiotreitolo (Sputasol-Oxoid).

Il Nekal BX si compone di due diverse soluzioni, la prima costituita dalla combinazione di diisobutil-naftalina-sulfonato e di NaOH 0,05%, e la seconda contenente CaCl₂ e BaCl₂. L'aggiunta della prima soluzione al materiale, in rapporto 5:1 (2 ml del campione+ 10 ml di decontaminante), esplica contemporaneamente azione fluidificante e decontaminante, mentre la seconda (2 gocce) favorisce la sedimentazione delle particelle corpuscolate e quindi anche dei micobatteri eventualmente presenti. La semina, eseguita dopo un'incubazione "overnight" a temperatura ambiente, si esegue recuperando il sedimento dal fondo del provetto-ne.

Per la valutazione della lesività sono state confrontate le colture (tempo di positivizzazione, numero delle colonie, aspetto eugonico o disgonico delle medesime) ottenute seminando su Lowenstein-Jensen diverse diluizioni di tre sospensioni batteriche delle quali, una non trattata, una decontaminata con Bactofen, ed una decontaminata con Nekal BX. L'inoculo è stato accuratamente standardizzato tenendo conto del fattore di diluizione rappresentato dall'aggiunta dei vari agenti decontaminanti.

Nelle prove di decontaminazione è stata valutata l'efficacia dei due diversi trattamenti nell'impedire l'inquinamento dei terreni di Lowenstein-Jensen inoculati con gli escreti ad alta carica batterica non specifica di cui si è detto sopra.

Nelle prove di impiego dei due metodi nella routine sono stati confrontati i risultati ottenuti nelle colture di escreti con batterioscopico per bacilli alcool-acido-resistenti positivo (n° 76) e negativo (n° 29).

RISULTATI

I risultati delle prove di lesività sono sintetizzati nella Tabella 2 dalla quale risulta che entrambi i decontaminanti sono ben tollerati dai micobatteri, anche se il Nekal BX sembra essere leggermente più lesivo rispetto al Bactofen. La morfologia delle colonie non pare influenzata dal trattamento: da 2 delle 10 sospensioni batteriche si sono infatti sviluppate colonie disgoniche ma tale carattere non risulta correlato all'azione del decontaminante dato che compare sia nei controlli che nelle colture da sospensioni trattate. La comparsa della crescita sui terreni inoculati con le sospensioni tenute a contatto col Nekal BX presenta mediamente un ritardo di 5 giorni rispetto a quella delle colture trattate con Bactofen che invece sono sovrapponibili ai controlli.

Decisamente più indicativi sono i dati relativi alle prove di decontaminazione. Si passa infatti da un percentuale di inquinamenti del 19,6% per i materiali trattati con ditiotreitolo e Bactofen, a quella del 2% per gli escreti decontaminati con Nekal BX; si tratta di differenze largamente significative in base al calcolo del chi-

	A	B
Colturali positivi	67 (77,9%)	67 (77,9%)
Colturali inquinati	7 (8,1%)	1 (1,1%)
Colturali negativi	12 (13,9%)	18 (20,9%)

Tabella 3. Confronto delle colture di 86 escreati positivi ottenute con le due metodiche di decontaminazione. (A= Sputasol + Bactofen; B= Nekat BX)

quadrato ($P < 0.05$).

Dall'esame della flora batterica presente nei campioni le cui colture si sono poi inquinate (vedi Tabella 1) emerge chiaramente la difficoltà di neutralizzare la *Pseudomonas aeruginosa*; essa è infatti presente in oltre la metà degli inquinamenti dopo trattamento con Sputasol e Bactofen e nell'unico inquinamento avutosi nei campioni decontaminati con Nekat BX. Di dubbio significato sono invece le frequenze di inquinamento dei campioni contenenti specie batteriche diverse dal bacillo piociano, tali percentuali, una volta corrette (eliminando cioè i casi in cui le specie suddette sono associate alla *Ps. aeruginosa*) sono infatti più modeste o sono relative a germi presenti in numero troppo esiguo di escreati. I dati di maggiore interesse sono certamente quelli relativi alle prove condotte sui 105 escreati di soggetti selezionati per precedenti positività all'esame batterioscopico per la ricerca di bacilli alcool-acido-resistenti. Di essi, 19 sono risultati, in questa sperimentazione, negativi sia microscopicamente che nelle colture susseguenti ad entrambi i trattamenti decontaminanti. Tali campioni sono stati quindi considerati "negativi veri" ed eliminati dalla casistica che risulta pertanto relativa ad 86 escreati positivi, 76 (88,4%) dei quali positivi anche batterioscopicamente. I dati riportati nella Tabella 3 evidenziano una sorprendente identità della percentuale di positività nelle due metodiche.

Al riguardo merita di essere segnalato che 60 escreati hanno dato colture positive con entrambi i metodi mentre 14 con uno solo dei due; dei campioni con batterioscopico positivo il cui colturale è risultato negativo con entrambi i trattamenti, 6 appartenevano a soggetti in cui il riscontro di tale discordanza fra microscopico e coltura si manifesta costantemente (anche al di fuori degli esami presi in considera-

zione in questa casistica) ed è quindi verosimile l'ipotesi della non vitalità dei bacilli tanto più che si tratta di pazienti da tempo sotto terapia. Non deve invece sorprendere il notevole divario fra le percentuali di inquinamento riscontrate in questo gruppo di escreati e quelle relative alle prove di decontaminazione. Il rapporto di 1:2 esistente fra le due casistiche (che conservano però invariata la proporzione legata ai due diversi trattamenti decontaminanti) è infatti largamente giustificato dai criteri che hanno guidato la selezione dei campioni: in base a precedenti positività in un caso, ed in base alla presenza di abbondante flora "contaminante" nell'altro.

I dati relativi al tempo medio di positivizzazione confermano quelli emersi dalle prove di lesività, si passa infatti da una media di 29,1 giorni nei materiali trattati con diotretolo e Bactofen, ai 30,0 giorni in quelli col Nekat BX.

Di nessun interesse è risultata invece l'osservazione dell'aspetto delle colonie sul quale il trattamento decontaminante è risultato influente nel 74% dei casi mentre nel restante 26% il riscontro di colonie eugoniche in una coltura e disgoniche nell'altra risulta distribuito pressoché omogeneamente fra le due metodiche.

DISCUSSIONE

Dall'esame dei dati riportati sembra che possa essere desunta la validità di entrambi i metodi presi in esame.

La minor lesività del sistema da tempo in uso nel nostro Laboratorio, che, in linea teorica potrebbe permettere la positivizzazione di un maggior numero di colture, è infatti controbilanciata dalla sua minore efficacia decontaminante che comporta la perdita per inquinamento di qualche positivo.

Non trascurabile é comunque il vantaggio che il Bactofen presenta per ciò che riguarda la precocità di positivizzazione.

Per quanto concerne la semplicità di esecuzione, le metodiche, entrambe "essenziali", non presentano problemi operativi. Tuttavia la tecnica già in uso nel nostro Laboratorio, non comportando trasferimenti di materiale (fluidificante e decontaminante vengono aggiunti direttamente nel contenitore), permette, in caso di richiesta contemporanea di colturale per micobatteri ed "altri germi" (richiesta per noi assai frequente), di avere a disposizione, per eseguire le semine su piastra, l'escreato fluidificato prima che ad esso venga aggiunto il decontaminante.

CONCLUSIONI

In accordo con la regola per cui l'impiego di più di un metodo di decontaminazione (ed eventualmente di terreni diversi) aumenta il rison-

tro delle positività, ci é parso utile affiancare al metodo di routine la decontaminazione con Nekal BX. Non essendo possibile, per motivi economici ed organizzativi, estendere tale doppio trattamento a tutti i materiali esaminati, esso é stato per il momento limitato ai soggetti di cui, in campioni precedenti, non si é potuto portare a termine l'esame colturale (si tratta per lo più di portatori di *Ps. aeruginosa*); tali esperienze, nonostante il limitato periodo di applicazione; ha già portato all'isolamento di micobatteri in 2 colture che invece con la metodica tradizionale si erano inquinate.

Un terreno tutto da esplorare é, per quanto riguarda l'efficacia decontaminante del Nekal BX, quello della coltura dei micobatteri nelle feci. Se infatti tale trattamento riuscisse a contenere entro limiti accettabili gli inquinamenti, tale ricerca, che riveste notevole interesse specialmente nei soggetti affetti da AIDS, diverrebbe finalmente accessibile.

BIBLIOGRAFIA

1. Annuario statistico ISTAT 1984.
2. Carpi Torelli P., Tortoli E. Impiego del dodecil-di (beta-ossietil) benzilammonio-cloruro [Bactofen] come decontaminante nell'esame colturale per la ricerca del bacillo di Koch nell'escreato. *Quad. Sclavo Diagn.* 16, 196-205, 1980.
3. DIN 58943 Teil 8 Nov. 1983 (Norme ufficiali della Repubblica Federale Tedesca).
4. Tortoli E. Micobatteri in: Pasquinelli F. *Diagnostica e tecniche di laboratorio*. Ed. Rosini, vol. 2°, 380-408, 1981, Firenze.
5. Tortoli E. Prime valutazioni sull'impiego del cloruro di dodecil-di (beta-ossietil)-benzilammonio quale decontaminante di routine per l'isolamento dei micobatteri. *Quad. Sclavo Diagn.* 17, 277-282, 1981.
6. Tortoli E., Carpi Torelli P. Influenza del sistema di decontaminazione sull'isolamento dei micobatteri non tubercolari dell'escreato in: Covelli I., Mandler F., Vaiani R. Editori. *Patogeni emergenti*. 217-221, 1983, Milano.
7. Warlo D., Die Vorhandlung von Untersuchungsmaterial mit Nekal BX für den Kulturversuch in der Tuberkulosediagnostik.