Caleidoscopio

51

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

ENRICO TORTOLI
M. TULLIA SIMONETTI

I micobatteri

Laboratorio di Batteriologia
e Virologia USL 10/D -
Firenze

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40-Genova (Italy) Tel. 010 808051

Stampato a Genova
1990.

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Informazioni generali. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

Testo. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

Frontespizio. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono e fax) responsabile della corrispondenza.

Bibliografia. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

Tabelle e figure. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

Unità di misura. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

Abbreviazioni. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

Presentazione della monografia. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con una lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Sebbene la tubercolosi sia nota da tanto tempo e sia opinione comune che questa malattia sia stata ormai debellata, l'analisi di alcuni studi retrospettivi sulla epidemiologia di questa patologia riserva delle sorprese non trascurabili.
Restringendo l'interesse alla sola Europa si trova che, in una recente revisione, su 104 pazienti morti per tubercolosi e per le sue complicazioni negli ultimi venti anni in un ospedale generale, soltanto su 20 pazienti (19,2%) era stata fatta la diagnosi in vita.
Gli Autori riconoscevano quali cause di questi errori diagnostici le difficoltà nel riconoscere i quadri acuti e generalizzati della tubercolosi, le gravi condizioni dei pazienti, l'età avanzata di numerosi pazienti, che presentavano quindi altre malattie concomitanti, le inadeguate indagini diagnostiche ma anche la scarsa attenzione del clinico alle manifestazioni della tubercolosi oggi.
E' quindi quanto mai giustificata ed attuale questa monografia su questo argomento.
Il volume è articolato in capitoli chiari che, iniziando con l'inquadramento generale dei micobatteri, proseguono con lo studio delle loro caratteristiche biologiche, quindi delle specie isolabili ed i più recenti criteri classificativi. Vengono in seguito analizzate la patogenicità, gli aspetti immunologici, per arrivare alla parte fondamentale rappresentata dalla diagnostica di laboratorio (esame microscopico, colturale, tipizzazione, antimicobatteriogramma) che si conclude con la presentazione dei più moderni rapidi metodi quali la radiometria, le sonde molecolari e la cromatografia.
Il volume è quindi completo, aggiornato e sicuramente potrà essere di pratica utilità al laboratorista, all'infettivologo ma anche al clinico che deve porre dei quesiti corretti.
E' giusto adesso presentare brevemente i due Autori di questa interessante monografia.
Il dottor Enrico Tortoli, laureatosi a Firenze, lavora sin dal 1970 presso il Laboratorio di Batteriologia e Virologia dell'Ospedale di Careggi della stessa città. Specializzato in Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, si occupa da oltre quindici anni di batteriologia dell'apparato respiratorio con particolare riguardo ai micobatteri sui quali ha pubblicato numerosi articoli e monografie. Attualmente sta lavorando alla messa a punto di un programma per l'identificazione computerizzata dei micobatteri.
La dottoressa Maria Tullia Simonetti si è laureata anch'essa a Firenze, lavora dal 1978 presso il Laboratorio di Batteriologia e Virologia dell'Ospedale di Careggi ove si dedica alla batteriologia dell'apparato respiratorio, argomento che è stato oggetto di numerose ed interessanti pubblicazioni.

Sergio Rassu

Generalità

Le Actinomycetales

Come il nome stesso vuole sottolineare i micobatteri presentano, rispetto agli altri schizomiceti, alcune caratteristiche atipiche che sembrano avvicinarli per certi versi ai miceti. In realtà il loro status di batteri non è in discussione, anche se all'interno di un ordine, quello delle *Actinomycetales*, un po' particolare. Di tale ordine fanno parte otto famiglie: quella delle *Mycobacteriaceae* appunto, e, per citare solo quelle di interesse clinico, *Actinomycetaceae, Nocardiaceae* e *Streptomycetaceae* [4]. La famiglia delle *Mycobacteriaceae* comprende il solo genere *Mycobacterium* con una quarantina di specie metà delle quali prive di interesse pratico.

Morfologia

La morfologia dei micobatteri, pur presentando leggere differenze caratteristiche di certe specie particolari, è sostanzialmente omogenea. Si tratta infatti di bacilli sottili piuttosto allungati le cui dimensioni variano da 1 a 5 μm mentre il diametro trasverso è compreso fra 0,2 e 0,6 μm. Forme coccobacillari, difficilmente reperibili in materiali patologici, sono assai comuni nei preparati allestiti da colonie. La collocazione dei micobatteri in relazione alla colorazione di Gram è priva di interesse e non del tutto certa; i più li considerano Gram positivi. La colorazione mette talvolta in evidenza lungo il corpo dei micobatteri, in genere leggermente incurvato, delle disomogeneità di struttura che possono dare l'impressione di una morfologia a catenella; si tratta in realtà di artefatti dovuti ad inclusioni citoplasmatiche dotate di ridotta affinità per i coloranti. Nei micobatteri non esistono organuli locomotori.

Caratteristiche biologiche

I micobatteri, la cui diffusione nell'ambiente è piuttosto ampia, (si possono infatti ritrovare nelle acque, nel suolo, negli alimenti, oltre che come ospiti di varie specie animali), sono aerobi stretti o microaerofili. Non sono né mobili né sporigeni e presentano, ad eccezione di poche specie, ritmi riproduttivi estremamente lenti. Il tempo medio di duplicazione, che è di circa 20' nelle enterobatteriacee, supera qui infatti di

media le 15 h. Ad eccezione del *M. leprae*, tutte le specie possono essere coltivate, la maggior parte di esse richiede però l'impiego di terreni assai complessi. Le colonie, la cui morfologia presenta peculiarità legate alla specie di appartenenza, sono prevalentemente di tipo ruvido e non di rado caratterizzate da una disposizione orientata ed assai serrata dei bacilli che le compongono.

Struttura cellulare

All'osservazione al microscopio elettronico i micobatteri presentano una parete cellulare assai spessa dalla quale si protendono verso l'interno i primi abbozzi dei setti trasversi che porteranno poi alla divisione cellulare (mesosomi). Fra i componenti della parete cellulare si ritrovano il peptidoglicano ed il diaminopimelato, oltre a polisaccaridi quali il glucano, il mannano, l'arabino-galattano e l'arabino-mannano. Particolarmente ricco è il corredo di inclusi citoplasmatici fra i quali predominano lipidi, glicogeno e polimetafosfati.

I lipidi della parete batterica

Gran parte delle proprietà esclusive che caratterizzano il genere *Mycobacterium* sono, direttamente o indirettamente, legate alla struttura della parete cellulare. Il contenuto lipidico, già straordinariamente elevato nell'insieme della cellula micobatterica, (25%, cioè superiore di 10-50 volte rispetto a quello degli altri batteri) raggiunge a livello della parete valori elevatissimi (oltre il 60% del peso secco). Ma le differenze di tipo quantitativo della componente lipidica della parete cellulare, pur rilevantissime, non sono le più significative. Del tutto inconsueti sono infatti, per gli schizomiceti, alcuni grassi composti nei quali, alla parte lipidica, si associano zuccheri e glicoproteine dando luogo alla formazione di glicolipidi e glicopeptidolipidi noti col nome di micosidi (fig. 1).

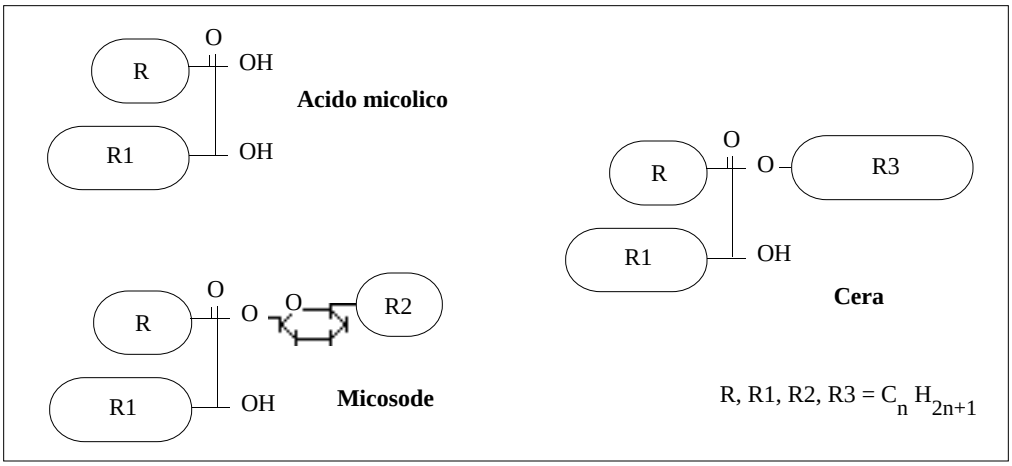


Figura 1. I lipidi della parete dei micobatteri.

Gli acidi micolici sono quelli che più di frequente si trovano esterificati nelle molecole lipidiche, si tratta di acidi grassi β-idrossilati caratterizzati da una lunga catena satura (ramificata in posizione α) di atomi di C (da 83 a 93). Tali acidi micolici, che non si ritrovano in altre specie batteriche, sono i costituenti base dei micosidi. Il rapporto dei vari tipi di micosidi si mantiene, all'interno delle singole specie, costante; il suo studio può quindi fornire un valido aiuto anche a fini tassonomici. A livello della superficie esterna della cell wall gli acidi micolici svolgono la funzione di recettori fagici. Un'altra classe assai importante di lipidi, non limitata ai micobatteri ma presente anche nei corinebatteri, è quella delle cere, esteri di acidi grassi (fra i quali gli acidi micolici) ed alcoli. La cera D, che in realtà è un glicopeptidolipide, è soprattutto nota per le sue proprietà adiuvanti; essa infatti, se inoculata in emulsione idro-oleosa associata ad un antigene proteico, potenzia enormemente la risposta immune umorale e cellulare del soggetto ricevente verso l'antigene suddetto [78]. Un micoside oggetto di studi approfonditi è il dimicolil-trealoso meglio noto col nome di fattore cordale, così chiamato perché i micobatteri tubercolari, privati di tale sostanza, perdono la caratteristica di svilupparsi, su certi terreni di coltura, in fasci serpentiformi. E' questa una caratteristica verosimilmente legata a quella della virulenza come sembrano indicare sia il fatto che il contenuto in fattore cordale è più elevato negli stipiti virulenti, sia alcune proprietà dello stesso, quali la sua letalità per il topo (per via intraperitoneale) e l'attività inibente la migrazione dei polimorfonucleati [47]. Il carattere della virulenza, tuttavia, sembra anche correlato ad un glicolipide solfonato presente in elevata concentrazione nei ceppi forniti di tale proprietà.

Struttura antigenica

Nei micobatteri sono stati identificati circa una trentina di antigeni, molti di essi sono comuni a più specie del genere *Mycobacterium* ed alcuni cross-reagiscono anche con nocardie e corinebatteri che hanno, con i micobatteri, affinità per quanto riguarda la parete cellulare.

Sensibilità ai chemio-antibiotici

Anche per la sensibilità ai farmaci i micobatteri si differenziano dagli altri microorganismi. La specie più significativa per la patologia umana, il *M. tuberculosis*, è infatti resistente praticamente a tutti gli antibiotici usati comunemente nel trattamento di infezioni da batteri Gram positivi e Gram negativi e sensibile solo ad un ristretto numero di farmaci definiti appunto antitubercolari. La sensibilità a tali sostanze è abbastanza costante, almeno per quanto riguarda i ceppi isolati da soggetti non sottoposti a terapia, anche in virtù del fatto che nel micobatterio tubercolare non sembra esistano resistenze di tipo plasmidico.

Le specie isolabili da materiali biologici di provenienza umana

Criteri classificativi

Per molti anni le sole specie di micobatteri coltivabili note sono state *M. tuberculosis, M. bovis* e *M. avium* (ritenuto inizialmente non patogeno). In seguito furono isolati i primi micobatteri "atipici" e nel 1959 Runyon [51] propose una loro classificazione in quattro gruppi, basata sulla velocità di crescita e sulla pigmentazione delle colonie. Successivamente divenne chiaro che all'interno di ciascun gruppo erano comprese diverse specie e, ancora, che all'interno di ciascuna di esse i singoli ceppi potevano discostarsi dal pattern di reazioni considerato caratteristico. Ne è derivata la necessità di prendere in considerazione diversi tests contemporaneamente (evitando di procedere per singole reazioni a cascata: chiave dicotomica), in modo che l'identificazione di un ceppo sconosciuto corrispondesse al miglior matching (adattamento) di esso ad un pattern prefissato di reazioni. Gli studi tassonomici hanno portato ad individuare, all'interno del genere *Mycobacterium*, 30 specie a cui se ne aggiungono altre 11 per il momento non ufficialmente riconosciute (*incertae sedis*) [52]. Sono stati così proposti vari mini-schemi diagnostici basati su un numero limitato di reazioni-chiave, e rispondenti al triplice requisito di essere semplici, riproducibili ed in grado di identificare i micobatteri di importanza clinica. Lo schema più semplice è certamente quello proposto da Marks [38], basato sull'esecuzione di pochi tests (6) e sul rilevamento dell'optimum di temperatura, esso riconosce 5 gruppi: psicrofili, mesofili, mesofili stretti, ad ampio spettro e termofili. Lo schema più diffuso, anche se non di rado variamente modificato, è quello di Kubica [27] che, facendo ricorso a 12 tests di base da integrare a seconda dei casi con 7 tests aggiuntivi, permette l'identificazione di 18 fra specie e complessi micobatterici.

La classificazione di Runyon

La classificazione di Runyon può, in linea generale, essere ancora oggi ritenuta valida ed utile come primo approccio identificativo. Da essa restano esclusi i micobatteri del *M. tuberculosis complex* e le specie *M. ulcerans* e *M. leprae*; tutte le altre risultano distribuite in quattro gruppi (tab. 1).

	M.ulcerans; M.leprae
M. tuberculosis complex:	M.tuberculosis; M.bovis; M.bovis BCG; M.africanum
I gruppo Fotocromogeni:	M.asiaticum; M.kansasii; M.marinum; M.simiae
II gruppo Scotocromogeni:	M.flavescens; M.gordonae; M.scrofulaceum; M.szulgai; M.xenopi
III gruppo Non cromogeni:	M.avium; M.intracellulare; M.gastri; M.haemophilum; M.malmoense; M.nonchromogenicum; M.terrae; M.triviale
IV gruppo a rapida crescita:	M.chelonae; M.fortuitum; M.phlei; M.smegmatis; M.vaccae

Tabella 1. Classificazione dei micobatteri non tubercolari secondo Runyon, (sono stati aggiunti il M.tuberculosis complex e le specie M.ulcerans e M.leprae non comprese in alcun raggruppamento).

Al I gruppo di Runyon appartengono i ceppi a lenta crescita fotocromogeni, capaci cioè di produrre pigmento solo dopo esposizione alla luce. I più importanti dal punto di vista clinico sono *M. kansasii* e *M. marinum.* Al II gruppo appartengono i ceppi a lenta crescita scotocromogeni (o cromogeni veri) in grado di produrre pigmento anche al buio. Ne fanno parte patogeni come *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, (che se coltivato a 25°C è però fotocromogeno) e *M. xenopi* (che alcuni Autori assegnano al III gruppo). Il III gruppo comprende stipiti a lenta crescita non cromogeni fra i quali sono clinicamente importanti le specie *M. avium* e *M. intracellulare*. Il IV gruppo è costituito da micobatteri a rapida crescita e comprende i potenziali patogeni *M. fortuitum* e *M. chelonae*.

Il *M. tuberculosis complex*

Il *M. tuberculosis complex* comprende le specie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG e *M. africanum*.

1) *Mycobacterium tuberculosis*. E' l'agente eziologico della tubercolosi (v. pag.15) e di gran lunga il micobatterio di più frequente isolamento da materiali patologici. Con gli altri del complesso ha in comune la caratteristica di perdere l'attività catalasica in seguito a riscaldamento a 68°C mentre da essi si differenzia per la produzione di niacina. La crescita sui terreni di coltura per micobatteri è lenta (3-9 settimane con optimum di temperatura a 37°C). Le colonie, non pigmentate, sono rugose, friabili, secche e difficilmente emulsionabili; su terreni a base di agar e acido oleico gli elementi bacillari tendono a formare cordoni circonvoluti (fig. 2, 3).

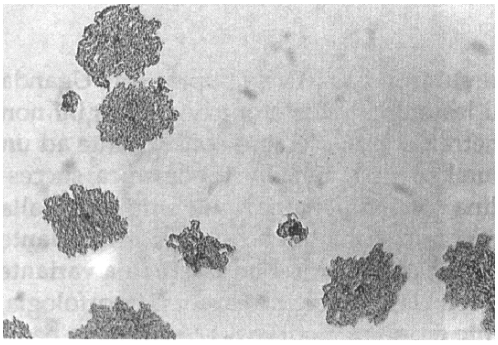


Figura 2. Colonie di M. tuberculosis al microscopio (100x), si nota la disposizione dei bacilli in fasci serpentiformi.

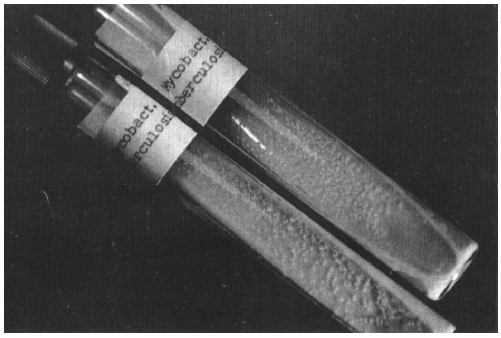


Figura 3. Colture di M. tuberculosis su Lowenstein-Jensen

2) *Mycobacterium bovis*. E' responsabile della tubercolosi bovina ed è un importante agente potenziale di infezione tubercolare anche per l'uomo. Oggi, per effetto della pasteurizzazione del latte e del controllo del bestiame, il *M. bovis* è quasi completamente scomparso dai paesi più sviluppati. La via di infezione principale è quella alimentare: i microorganismi ingeriti, passando attraverso la mucosa intestinale, raggiungono i linfonodi cervicali o quelli mesenterici. L'infezione si può diffondere poi alle ossa ed alle articolazioni (tessuti per i quali il *M. bovis* sembra avere un particolare tropismo) producendo caratteristiche deformazioni vertebrali. Non infrequente è la trasmissione per via inalatoria (soprattutto fra gli allevatori di bestiame ed i lavoratori dei caseifici) che dà luogo ad una forma polmonare indistinguibile dalla tubercolosi da *M. tuberculosis*. Il *M. bovis* cresce stentatamente (crescita disgonica) sui comuni terreni all'uovo perché inibito dalla presenza di glicerolo mentre risulta stimolato dall'aggiunta di piruvato. Su Lowenstein-Jensen le colonie sono piccole, biancastre, rotonde, generalmente lisce e facilmente emulsionabili. Su terreni all'agar le colonie, ugualmente piccole, appaiono non cordonate, ma se il mezzo contiene piruvato assumono un aspetto molto simile a quello del *M. tuberculosis*. Da quest'ultimo il *M. bovis* si distingue biochimicamente per la negatività dei tests della niacina e dei nitrati. Da tutte le altre specie micobatteriche lo distingue la sensibilità all'idrazide dell'acido tiofen2-carbossilico.
3) *Mycobacterium bovis* BCG. Il bacillo di Calmette e Guérin è un mutante attenuato del *M. bovis* ottenuto mediante numerosi passaggi seriali su terreni sfavorevoli (contenenti bile). Viene usato, per via intradermica, nella vaccinazione antitubercolare dell'uomo. La morfologia coloniale è simile a quella del *M. tuberculosis* (colonie eugoniche rugose); i tests biochimici sono analoghi a quelli del *M. bovis* con la sola differenza di una più intensa e rapida attività ureasica.
4) *Mycobacterium africanum*. E' responsabile, in vaste zone dell'Africa equatoriale, di infezioni clinicamente indifferenziabili da quelle provocate dal *M. tuberculosis* . Le sue colonie sono disgoniche, del tipo di quelle del *M. bovis*; le altre caratteristiche sono intermedie fra quelle del *M. tuberculosis* e quelle del *M. bovis* medesimo; mancano reazioni chiave atte a differenziarlo in modo inequivocabile.

M. ulcerans

La sua diffusione è limitata alle aree tropicali e subtropicali (Africa, soprattutto Uganda e Zaire, ed Australia) ove è responsabile di lesioni cutanee croniche a margini non definiti, simili a quelle lepromatose. La penetrazione può essere conseguente ad un trauma cutaneo, anche di lieve entità come quello di una iniezione ipodermica; successivamente il *M. ulcerans* inizia a produrre una tossina necrotizzante e dà luogo alla comparsa di un piccolo nodulo sottocutaneo non dolente che si fà poi fluttuante allargando i propri margini e ulcerandosi. Il *M. ulcerans* potrebbe essere una variante termosensibile del *M. tuberculosis* a cui risulta correlato per alcuni caratteri (morfologia, caratteristiche antigeniche). Cresce lentamente e può richiedere 6-12 settimane per il primo isolamento, non è pigmentato e dà colonie rugose, disgoniche. Caratteristica è l'estrema ristrettezza del range di temperatura di crescita (31-33°C) risultando tale specie totalmente inibita a temperature superiori a 35°C.

M. leprae

Il *M. leprae*, agente eziologico della lebbra (v. pag16), è l'unico micobatterio che non può essere coltivato in vitro. La sola prova eseguibile in laboratorio è la ricerca, da lesioni della cute e delle mucose, di bacilli alcool-acido resistenti; tali bacilli si presentano in genere disposti parallelamente e strettamente addossati gli uni agli altri. E' possibile indurre artificialmente nel topo la comparsa di lesioni localizzate mediante inoculazione di materiale patologico nella regione plantare.

I micobatteri fotocromogeni

M. kansasii (fig. 4) e *M. marinum* sono entrambi fotocromogeni ed entrambi capaci di idrolizzare il Tween 80 ma differiscono per il diverso range di temperatura di crescita. Mentre infatti il *M. kansasii* ha l'optimum a 35-37°C il *M. marinum* cresce meglio a 30°C ed abbastanza rapidamente anche a 25°C. Questa differenza, assieme con la diversa zona di isolamento del germe (lesioni generalmente polmonari per il *M. kansasii* e cutanee per il *M. marinum*) facilitano la diagnosi differenziale alla quale contribuisce anche il test della riduzione dei nitrati (positivo nel *M. kansasii* e negativo nel *M. marinum*). L'esistenza di ceppi di *M. kansasii* non pigmentati e di altri con pigmentazione indipendente dalla luce (correlati con una patogenicità ridotta) può portare ad erronee attribuzioni al III o al II gruppo di Runyon. Peculiare del *M. kansasii* è l'aspetto microscopico zebrato delle cellule; tale caratteristica risulta particolarmente evidente nei preparati allestiti da colture in terreno liquido contenente Tween 80. Il *M. kansasii* ha un'intensa attività catalasica con l'eccezione di ceppi a patogenicità ridotta [73]. Fanno parte del I gruppo anche il *M. simiae* ed il *M. asiaticum*. Il primo può essere associato a patologie polmonari; pur producendo niacina è difficilmente confondibile con il *M. tuberculosis* per la presenza di pigmento. Il *M. asiaticum* ha caratteristiche simili al *M. simiae* (entrambi sono stati isolati per la prima volta da scimmie) ma se ne distingue per la negatività della niacina; è raramente associato a malattia.

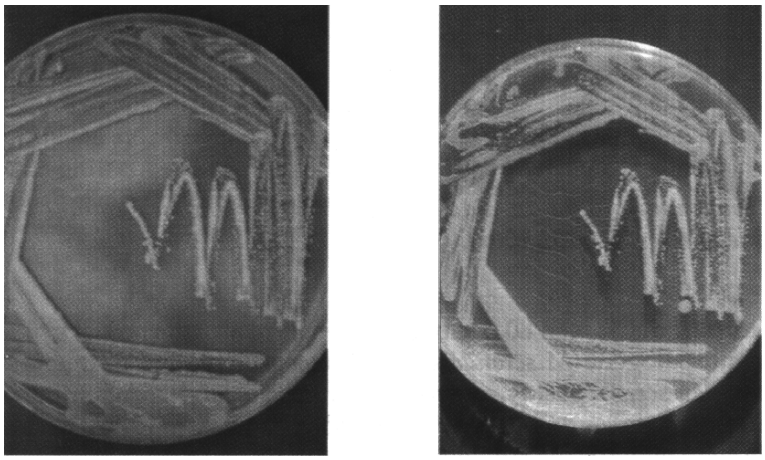


Figura 4. Coltura di micobatterio fotocromogeno (M. kansasii) prima e dopo esposizione alla luce.

I micobatteri scotocromogeni

La scotocromogenicità non è proprietà esclusiva del II gruppo di Runyon: sono infatti scotocromogeni anche molti ceppi di *M. avium/intracellulare* isolati in USA, (caratteristica particolarmente evidente nelle colture vecchie) ed alcune varietà di *M. kansasii*. La non univoca definizione del gruppo è inoltre confermata dall'attribuzione, da parte di alcuni Autori, del *M. xenopi*, pur caratterizzato da un tipico pigmento giallo, al III gruppo; e dal singolare comportamento del *M. szulgai*, scotocromogeno se cresciuto a 37°C e fotocromogeno a 25°C. Il *M. scrofulaceum* è il principale responsabile di linfoadeniti, soprattutto latero-cervicali (scrofula), che possono tuttavia essere causate anche da *M. avium/intracellulare*, da *M. tuberculosis* o da *M. bovis*; non mancano però patologie polmonari o a carico di altri organi. *M. gordonae* e *M. flavescens* si ritrovano comunemente come saprofiti; analoga considerazione può essere fatta per il *M. xenopi* la cui eventuale patogenicità è di tipo opportunistico venendo generalmente isolato da pazienti con preesistenti patologie polmonari predisponenti. Il *M. xenopi* ha un aspetto microscopico delle colonie abbastanza caratteristico: soprattutto le unità giovani presentano una morfologia "a nido di uccello" da cui si dipartono filamenti ramificati (fig. 5).

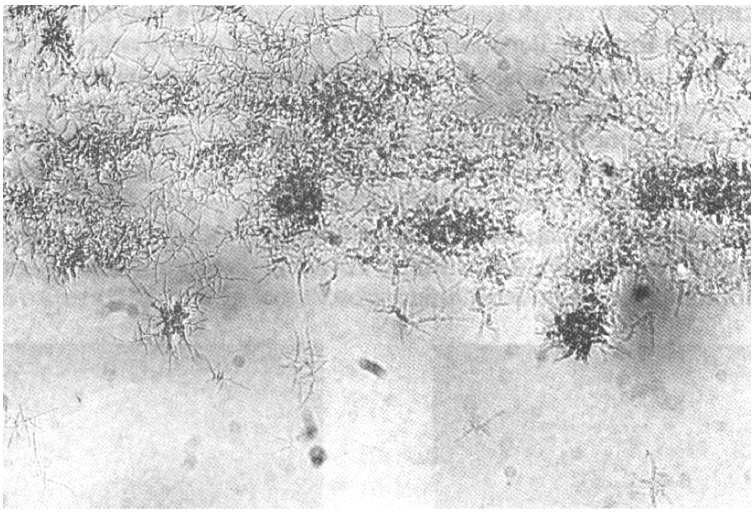


Figura 5. Tipica morfologia "a nido d'uccello" delle colonie giovani di M. xenopi (osservazione al microscopio, 100x).

Il test dell'idrolisi del Tween 80 permette di separare all'interno del gruppo le specie potenzialmente patogene (*M. scrofulaceum* e *M. xenopi*): negative, da quelle saprofite (*M. gordonae* e *M. flavescens*): positive entro 5 gg.; il *M. szulga*i presenta infine un comportamento intermedio essendo positivo solo dopo 7-10 gg. Altri tests discriminanti fra le varie specie sono quello della riduzione dei nitrati e quello dell'ureasi.

I micobatteri non cromogeni

Dal punto di vista clinico le specie più importanti del III gruppo sono *M. avium* e *M. intracellulare* nei confronti delle quali si è avuto un notevole incremento di interesse in questi ultimi anni, in seguito alla segnalazione di numerosi isolamenti (soprattutto in USA) da pazienti affetti da AIDS, nei quali danno luogo frequentemente ad infezioni disseminate [14]. Le specie *M. avium* e *M. intracellulare* sono praticamente indistinguibili mediante le prove convenzionali di identificazione e vengono spesso accomunate sotto la sigla MAC (*M. avium complex*). L'identificazione di specie è però possibile usando i DNA probes (v. pag.47) ed, in una certa misura, mediante sierotipizzazione (v. pag. 40). I sierotipi 1, 2 e 3 individuano ceppi appartenenti alla specie *M. avium*, mentre quelli da 12 a 20 sono attribuibili alla specie *M. intracellulare*; quelli infine compresi fra 4 ed 11 non sono per il momento ben definiti [37]. Negli Stati Uniti il sierotipo più frequente nei casi di AIDS è il 4, i cui stipiti si presentano pigmentati, seguito nell'ordine dai sierotipi 1 ed 8 [21]; diversa è invece la situazione in Italia dove l'isolamento di *M. avium* da soggetti immunodeficienti è estremamente raro e dove il sierotipo più comune è il 3; rarissimi sono infine i ceppi pigmentati. In primo isolamento le colonie del MAC sono generalmente lisce, piatte e trasparenti; non mancano però ceppi a colonie opache e rugose. La produzione di pigmento giallo si riscontra, anche se raramente, nelle colture invecchiate. Tale variabilità morfologica sembra correlata ad un diverso grado di virulenza e di sensibilità ai farmaci. Alcuni tassonomisti (in base all'analisi dei lipidi della parete batterica) associano alle specie *M. avium* e *M. intracellulare* anche il *M. scrofulaceum* ed altri ceppi scotocromogeni con caratteristiche intermedie costituendo così il MAIS complex [16]. Il test dell'idrolisi del Tween 80 è, come per le specie del II gruppo di Runyon, una prova chiave che permette di distinguere i patogeni del MAC, ai quali si aggiunge il *M. haemophilum*, dagli altri micobatteri non pigmentati. Alcuni ceppi di *M. triviale* producono colonie rugose assai simili a quelle di *M. tuberculosis*, la differenziazione da quest'ultimo non presenta però problemi essendo il *M. triviale* niacina-negativo e capace di crescere su terreni contenenti NaCl. Le specie *M. malmoense* [55], responsabile di infezioni polmonari, e *M. haemophilum* non risultano essere state mai isolate nel nostro Paese ma meritano di essere prese in considerazione poiché la loro frequenza di isolamento sembra essere in aumento un pò ovunque nel mondo. Il *M. haemophilum* [59], isolato per lo più da lesioni cutanee, ha un optimum di temperatura compreso fra 25° e 32°C e cresce in 2-7 settimane; non è invece capace di svilupparsi a 37°C [57]. Richiedendo emina, come fattore di crescita, si sviluppa su agar sangue e su agar cioccolato oltre che su 7H10 addizionato con eritrociti emolizzati e su Lowenstein-Jensen contenente citrato ferrico di ammonio.

I micobatteri a crescita rapida

I micobatteri del IV gruppo di Runyon sono comuni contaminanti del suolo e delle acque. Le specie clinicamente significative sono *M. fortuitum* e *M. chelonae*, spesso accomunate nel *M. fortuitum complex*; tutti gli altri micobatteri del gruppo non sono

patogeni ma è comunque buona norma identificarli affinché il loro isolamento da materiali patologici non induca il Clinico ad attuare terapie inopportune (Fig. 6). *M. fortuitum* e *M. chelonae* sono germi opportunisti che possono essere responsabili di lesioni cutanee e sottocutanee con formazione di ascesso fluttuante (con o senza fistolizzazione) e con eventuale linfoadenopatia regionale. La via di ingresso è generalmente costituita da ferite profonde; assai frequenti sono le infezioni iatrogene successive ad intervento chirurgico, ad innesto o ad iniezione ipodermica. Le infezioni generalizzate sono rare ma nei pazienti immunodepressi non sono infrequenti sepsi disseminate o localizzazioni cutanee multiple. Non mancano infine infezioni polmonari ed urinarie; l'isolamento da tali sedi è assai frequente in Italia. *M. fortuitum* e *M. chelonae* crescono in meno di 7 gg. sui comuni terreni di coltura anche se l'isolamento primario richiede tempi talvolta anche notevolmente più lunghi. Le colonie possono essere eugoniche (lisce) o disgoniche (rugose), non pigmentate; le colture mature di *M. fortuitum* possono presentarsi verdastre per incorporazione del verde malachite dal terreno. Su terreni all'agar le colonie di *M. fortuitum* sono caratterizzate, dopo 36-48 h, da estensioni filamentose ramificate e da corte ife aeree, visibili con uno stereomicroscopio. Diverso è il comportamento di *M. fortuitum* e *M. chelonae* nei confronti di numerose sostanze antimicrobiche, se si escludono infatti i farmaci antitubercolari, ai quali sono entrambi resistenti, il *M. fortuitum* è decisamente più sensibile, tanto che il test di sensibilità, ad esempio alla ciprofloxacina, può essere usato per distinguere le due specie. Anche il test dei nitrati risulta utile a tale scopo. Del *M. chelonae* sono note due sottospecie: *M. chelonae chelonae* e *M. chelonae abscessus* differenziabili per la capacità di quest'ultima di crescere, a differenza della prima, a 28°C su terreni contenenti NaCl al 5%. Gli altri micobatteri del IV gruppo possono essere differenziati dal *M. fortuitum complex* per l'intensa attività arilsolfatasica e la capacità di crescere su MacConkey che caratterizzano tale complesso.

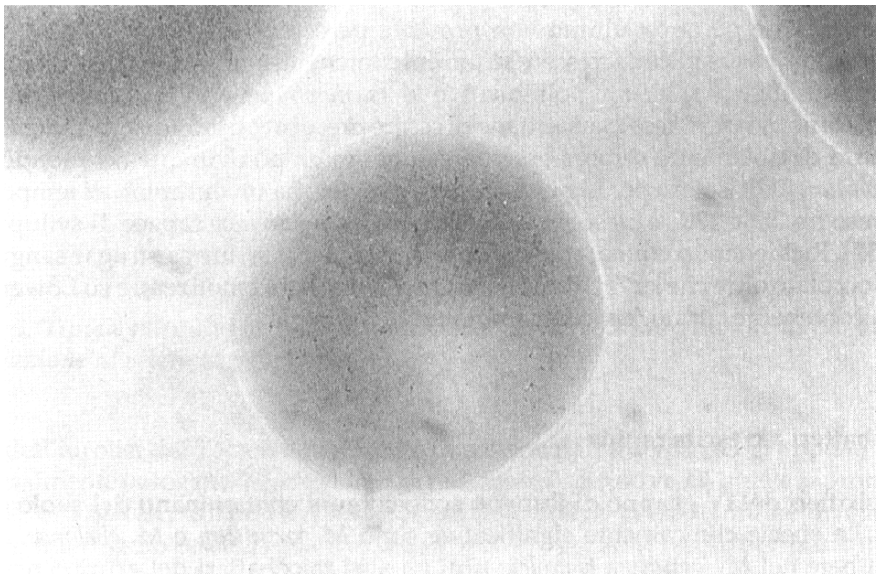


Figura 6. Colonie lisce di micobatterio a rapida crescita al microscopio (100x).

Patogenicità

L'infezione da micobatteri

La tubercolosi

I micobatteri tubercolari emessi nell'ambiente da soggetti portatori di lesioni aperte rimangono a lungo in sospensione nell'aria all'interno di minutissime goccioline di saliva. Mentre le goccioline più grandi non riescono, una volta inalate, a superare le difese meccaniche delle prime vie respiratorie, quelle con diametro <5 μm possono arrivare facilmente fino all'alveolo dove i micobatteri vengono fagocitati dai macrofagi. Una tale strategia difensiva, apparentemente vincente, è però frustrata dalla capacità del bacillo tubercolare di moltiplicarsi intracellularmente il che porta rapidamente alla morte del fagocita. Si manifesta a questo punto il processo flogistico che, provocando fra l'altro occlusioni vasali, avvia il meccanismo necrotico locale con richiamo di monociti circolanti che successivamente si trasformeranno in macrofagi. La moltiplicazione intracellulare prosegue ed alcuni dei batteri sopravvissuti raggiungono per via linfatica i linfonodi e quindi il sangue da cui vengono veicolati agli organi più disparati. Nella maggior parte dei casi la distruzione dei micobatteri, operata dall'effetto combinato della fagocitosi macrofagica e della insufficiente ossigenazione di molti degli organi raggiunti, porta all'arresto del processo infettivo che rimane così limitato al sito iniziale ove si possono formare dei noduli calcificati. E' questo il tipico quadro del processo primario in cui i bacilli, ancora viventi, possono rimanere indefinitamente bloccati allo stadio di vita latente. In seguito ad abbassamento delle difese immunitarie una simile situazione può però sfociare nella malattia tubercolare vera e propria: i micobatteri riprendono il loro ritmo proliferativo ed, approfittando della temporanea carenza di macrofagi attivati, aumentano considerevolmente il loro numero il che consentirà loro di respingere l'attacco del sistema immunitario quando questo sarà tornato ai normali livelli di efficienza. La ripresa del processo flogistico, la formazione dei tubercoli (noduli di macrofagi stratificati attorno al nucleo infettivo), la necrosi con formazione di sostanza caseosa che tende successivamente a liquefarsi, l'erosione del bronco con la conseguente cavitazione (caverna tubercolare), sono le tappe della successiva evoluzione della malattia. La tubercolosi è quindi una forma morbosa in cui le manifestazioni più significative sono conseguenza della risposta dell'organismo all'agente infettivo. Il tentativo di limitare al massimo la disseminazione dei bacilli, finisce infatti col danneggiare, spesso in modo irreversibile, il parenchima polmonare. Le forme tubercolari extra-polmonari sono conseguenza della dispersione dei bacilli verificatasi nella fase

batteriemica dell'infezione, e possono insorgere sia come forme secondarie alla malattia polmonare sia come forme primarie; le manifestazioni variano a seconda del distretto interessato.

Le micobatteriosi

Prendono il nome di micobatteriosi le infezioni da micobatteri non appartenenti al *M. tuberculosis complex*. Si tratta principalmente di infezioni polmonari con sintomatologia a decorso indistinguibile da quello della tubercolosi (pare sia diagnostico il reperto radiografico di caverne a margini sottili), di forme disseminate (tipiche degli immunodepressi), di patologie suppurative localizzate in distretti linfonodali, o di interessamento delle aree superficiali. Non infrequenti sono le infezioni di tipo iatrogeno. Diversamente dalla tubercolosi, nelle micobatteriosi sembra non esistere il contagio interumano. I MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis) sono infatti microorganismi a virulenza ridotta e la loro patogenicità è direttamente legata allo stato immunitario dell'ospite. Mentre per la diagnosi della malattia tubercolare anche l'isolamento singolo di un solo bacillo è clinicamente significativo; per le micobatteriosi (fatti salvi i casi in cui si isolano specie patogene quali *M. avium/intracellulare, M. kansasii, M. scrofulaceum*) sono stati proposti vari protocolli basati ciascuno su una serie di criteri diagnostici. Pur con diverse sfumature tutti concordano nel ritenere necessario il verificarsi di almeno una delle seguenti condizioni: isolamento ripetuto, presenza di cariche microbiche elevate, presenza di sintomatologia clinica [66].

AIDS ed infezioni da micobatteri

Quello delle micobatteriosi nei soggetti affetti da AIDS e uno dei capitoli più interessanti delle infezioni associate all'immunodeficienza acquisita. Il tema non verrà tuttavia trattato in questa sede essendo stato esaurientemente approfondito in un precedente volume (n° 47) di questa stessa collana.

La lebbra

La lebbra è una malattia cronica della cute e delle mucose che si estende progressivamente alle terminazioni nervose; il suo agente eziologico è il *M. leprae*. Si manifesta con macchie cutanee e con perdita della sensibilità e può raggiungere imponenti livelli di devastazione. La via di infezione sembra essere quella aerogena mentre di modesta importanza sarebbe il contatto cutaneo: i bacilli emessi con i colpi di tosse verrebbero inalati dal ricevente in cui andrebbero poi incontro a disseminazione per via linfoematica. La malattia può manifestarsi in forme di maggiore o minore gravità a seconda del livello di recettività dell'ospite: la popolazione normale è infatti refrattaria e vengono contagiati solo i soggetti con deficit di difese cellulari. Si passa pertanto, attraverso forme intermedie, dalla lebbra tubercoloide, in cui si hanno solo lesioni localizzate caratterizzate dalla presenza di granulomi, alla lebbra lepromatosa che tende a diventare ben presto generalizzata e che produce estese deformazioni dovute alla presenza nel derma di infiltrati macrofagici.

Immunologia

Immunità cellulare ed umorale

Il comportamento del sistema immunitario di fronte alle infezioni da micobatteri si differenzia dalla classica risposta alle più comuni infezioni batteriche. L'immunità umorale ha infatti un ruolo trascurabile: sebbene esistano anticorpi diretti verso vari antigeni micobatterici il loro titolo è sempre assai basso, anche nei soggetti affetti da tubercolosi, e non risulta che tali anticorpi svolgano alcun ruolo nel contenimento dell'infezione. Di ben altra portata ed efficacia è invece la risposta immune cellulo mediata specialmente in occasione di contatti con l'agente micobatterico, successivi al primo. La presenza di linfociti T attivati dal precedente contatto con l'antigene determina infatti l'immissione in circolo di linfochine, mediatori chimici dotati di attività chemiotattica nei confronti di granulociti e macrofagi e capaci di attivare questi ultimi mettendoli in grado di tenere sotto controllo la moltiplicazione intracellulare dei micobatteri. Sostanzialmente diversa è la natura dell'attivazione di linfociti T e macrofagi, la prima è infatti specifica e duratura, la seconda aspecifica e limitata a poche settimane. La struttura istologica caratteristica di questa situazione immunitaria è il tubercolo formato da una cellula gigante centrale (risultato della fusione di vari macrofagi) e da una zona periferica in cui altri macrofagi si stratificano assumendo un aspetto fogliaceo (cellule epitelioidi).

Il fenomeno di Koch

L'infezione, per via sottocutanea, di una cavia, con bacilli tubercolari determina, dopo 10-14 gg., la formazione, in corrispondenza dell'inoculo, di un nodulo che successivamente si ulcera e tale rimane fino alla morte dell'animale. L'infezione si estende, nelle fasi successive ai linfonodi zonali che vanno poi incontro a necrosi. La reinfezione di una cavia precedentemente contagiata con bacilli tubercolari provoca invece, nel giro di 2-3 gg., l'indurimento (senza formazione di noduli) della zona di inoculo che diviene scura e quindi si ulcera per poi guarire successivamente senza che si abbia interessamento linfonodale. In queste osservazioni di Koch (1891) [25] che descrivono il fenomeno dell'ipersensibilità ritardata (risposta infiammatoria accelerata in presenza di reinfezione) è racchiuso il principio dell'aumentata resistenza alle reinfezioni dei soggetti già precedentemente venuti in contatto col bacillo tubercolare: la pronta risposta cellulare

riesce a contenere, limitandola alla sede di inoculo, la disseminazione dell'agente infettivo. Vale la pena di ricordare, in calce a tali osservazioni, che mentre fino a qualche tempo fà la condizione di soggetto sensibilizzato era considerata un vantaggio (in relazione all'alta circolazione del micobatterio tubercolare nella popolazione), attualmente si tende a ritenere preferibile la mancanza di iperreattività. Con la diminuzione della circolazione del bacillo tubercolare infatti, mentre il rischio di contrarre la malattia si sta progressivamente riducendo, quello di una riattivazione di una forma latente, pur rimanendo invariato, diviene proporzionalmente più elevato.

I tests cutanei

Il perdurare, praticamente per tutta la vita, dell'ipersensibilità ritardata verso i micobatteri è sfruttato a scopo diagnostico ed epidemiologico nella reazione alla tubercolina. Come già Koch aveva messo in evidenza, per scatenare tale fenomeno non sono indispensabili i micobatteri integri ma è sufficiente un estratto proteico ottenuto per filtrazione da colture autoclavate di *M. tuberculosis* (la "tubercolina vecchia" di Koch o il più raffinato PPD, purified protein derivate). L'inoculazione intradermica di tale preparato antigenico provoca infatti, in caso di infezione pregressa o di tubercolosi in atto, la comparsa entro 48 h di un indurimento nella zona di inoculo. Fra le varie metodiche di intradermoreazione, la Mantoux (5 unità di PPD in 0,1 ml) è considerata quella di riferimento; per gli screening di massa si usa invece il Tine-test (sistema a punte multiple) di esecuzione più pratica ma ovviamente meno sensibile. Per la diagnostica delle principali micobatteriosi sono oggi disponibili una decina di micobatterine estratte dalle specie di MOTT clinicamente più significative, da inoculare in parallelo in varie zone dell'avambraccio. Non sempre tuttavia i risultati sono utili per la diagnosi dal momento che, a causa dell'elevata cross-reattività, non è infrequente la positività a 2 o più micobatterine.

La vaccinazione

Lo scopo della vaccinazione antitubercolare è quello di aumentare la resistenza nei confronti della malattia. Si impiega normalmente, somministrata per via intradermica, una sospensione di un ceppo di *M. bovis* BCG ottenuto da Calmette e Guérin, a partire dalla specie *M. bovis*, attraverso passaggi in serie su terreni resi sfavorevoli mediante aggiunta di bile. Per effetto della vaccinazione compare una reazione locale di modesta entità, con o senza interessamento delle linfoghiandole satelliti, cui fa seguito l'instaurarsi dell'ipersensibilità ritardata. L'utilità della vaccinazione antitubercolare è ancora oggi in discussione, mentre infatti le indagini condotte su popolazioni con elevata incidenza di tubercolosi sembrano dimostrare l'utilità di tale pratica, del tutto ininfluente pare il vaccino nelle casistiche relative a popolazioni con basse frequenze di malattia. Gli unici punti fermi sembrano essere oggi l'esclusione della pratica vaccinica nei soggetti tubercolino-positivi ed il ricorso ad essa nei soggetti a rischio non sensibilizzati. Se il viraggio alla tubercolino-positività non è intervenuto a distanza di 3 mesi dalla vaccinazione la medesima deve esser ritenuta inefficace e ripetuta.

Diagnostica di laboratorio

La sicurezza nel laboratorio di micobatteriologia

Essendo la tubercolosi una malattia in cui la via di contagio è essenzialmente aerogena, il rischio di contrarla è correlato soprattutto alla possibilità di passaggio di micobatteri in sospensione nell'aria (aerosol). Fra le manovre che si eseguono comunemente in laboratorio ve ne sono alcune (centrifugazione, agitazione, flambaggio dell'ansa, ecc.) che presentano un margine di rischio di formazione di aerosol, assai elevato, ed è quindi proprio verso tali operazioni che devono essere dirette la maggior parte delle misure di prevenzione. L'esistenza nel laboratorio di una cabina a flusso laminare verticale è condizione imprescindibile per l'effettuazione di qualsiasi operazione in cui sia, anche solo potenzialmente, coinvolto il micobatterio tubercolare. Per quanto riguarda in particolare i passaggi tecnici che più degli altri possono essere definiti a rischio è bene ricordare che:

a) la pericolosissima dispersione di bacilli che si verifica al momento della sterilizzazione alla fiamma di un'ansa contaminata può essere evitata ricorrendo ad inceneritori a resistenza elettrica o meglio all'impiego di anse monouso.

b) se l'impiego di provette e contenitori a perfetta tenuta (forniti di guarnizioni in plastica, gomma o simili) può essere sufficiente ad evitare la formazione di aerosol durante la centrifugazione o l'agitazione al vortex, solo la dislocazione dell'apparecchio all'interno di una cabina ventilata si rivela misura efficace nell'eventualità di rottura di una provetta in centrifuga.

c) prima di aprire un contenitore sottoposto ad agitazione od a centrifugazione è necessario attendere (almeno 15') la sedimentazione dei germi passati in sospensione nella fase gassosa. I contenitori con tappo a pressione sono da evitare perché, provocando depressione al momento dell'apertura, risospendono i bacilli sedimentati.

Al di là di questi accorgimenti particolari, valgono tutte le regole in vigore nei laboratori di batteriologia generale, dalla messa al bando del pipettaggio a bocca, alla necessità di autoclavare o incenerire qualsiasi materiale da scartare, al divieto di mangiare, bere e fumare in laboratorio, e così via. Per quanto riguarda poi i disinfettanti è forse utile ricordare che sono efficaci nei confronti dei micobatteri: i derivati fenolici (al 5%), la formaldeide (al 5%), la glutaraldeide (al 2%) e l'ipoclorito di sodio (allo 0,5%); per tutti il tempo di contatto varia dai 15 ai 30'. Del tutto privi di attività micobattericida sono i disinfettanti a base di derivati di ammonio quaternario.

I campioni biologici

L'escreato è il materiale su cui più di frequente viene eseguita la ricerca di micobatteri. Il contenitore per la raccolta dell'escreato deve essere sterile, fornito di tappo a vite, graduato, e preferibilmente di tipo monouso. La quantità di materiale necessaria non deve essere inferiore a 2 ml nè superiore a 10 ml. Poiché l'esame sia significativo è necessario che il campione non sia costituito da saliva ma provenga dalle vie respiratorie profonde; generalmente il momento più idoneo per la raccolta del materiale è al mattino poiché, per la posizione di decubito, le secrezioni bronchiali tendono ad accumularsi durante la notte. E' consigliabile, in caso di negatività del primo campione, ripetere l'esame per 3 gg. consecutivi. Nei pazienti nei quali non è possibile ottenere l'espettorazione si può cercare di indurla ricorrendo all'aerosol con una soluzione salina tiepida al 10%. Per coloro, in particolare i bambini, che hanno la tendenza a deglutire le secrezioni bronchiali, si può far ricorso al lavaggio gastrico da eseguire a varie ore di distanza dal pasto. Le modalità di raccolta dell'urina non sono universalmente standardizzate. Può essere utile differenziare i campioni a seconda dell'esame richiesto. Per l'esame microscopico si consiglia l'impiego dell'urina di 24 h e l'esecuzione della ricerca sul sedimento; per la coltura è preferibile un campione raccolto con la tecnica del mitto intermedio, in un contenitore sterile. Anche in questo caso può essere utile la ripetizione della prova su 3 campioni di 3 gg. consecutivi. Per i liquidi cavitari dovrebbero essere usate provette sterili contenenti citrato per evitare la formazione di coaguli di fibrina. Per il prelievo del sangue mestruale è consigliabile l'uso di una pipetta Pasteur in plastica. Ai prelievi mediante tampone è bene ricorrere nei casi in cui sia impossibile l'aspirazione ed il trasferimento del materiale in provetta. Sono da preferirsi i tamponi senza terreno di trasporto. Per la coltura dei micobatteri dal sangue è consigliabile l'esecuzione del prelievo utilizzando le apposite provette Isolator. Tutti i materiali, indipendentemente dalla loro natura, devono essere avviati immediatamente in laboratorio in contenitori sterili; quando ciò non è possibile possono essere conservati in frigorifero per non più di 48 h.

Esame microscopico

Alcool-acido resistenza

L'esame microscopio assume, per la ricerca dei micobatteri, una rilevanza diagnostica che non trova riscontro in altri settori della batteriologia, e ciò grazie alla peculiare proprietà di tali microorganismi di essere alcool-acido resistenti. La natura della alcool-acido resistenza non è ancora del tutto chiarita, essa sembra comunque correlata alla componente lipidica della parete cellulare: gli acidi micolici si complesserebbero infatti con la fucsina impedendone il rilascio nonostante il trattamento con alcool ed acido [1].

Lo striscio

Per l'allestimento di un preparato microscopico è indispensabile usare sempre vetrini nuovi e puliti; il materiale viene strisciato su una superficie piuttosto ampia ma generalmente non superiore a 3x1,5 cm. Per la concentrazione dei bacilli prima di strisciare il materiale, si ricorre alla centrifugazione (2000 x g per 30'); con gli escreati tuttavia si ottengono risultati migliori selezionando le porzioni dall'aspetto purulento. L'esame batterioscopico su campioni di urina di 24 h prevede la centrifugazione del sedimento e l'esecuzione di uno striscio che non deve risultare eccessivamente spesso. Nel liquor il preparato si esegue utilizzando il sedimento ottenuto per centrifugazione e, quando presente, il reticolo del Mya (tenue microcoagulo di fibrina che spesso si forma nel liquor rimasto per qualche ora a temperatura ambiente). Per le feci è consigliabile la concentrazione con etere: una palettata abbondante di materiale viene stemperata in 5 ml di soluzione fisiologica e omogeneizzata al vortex; si raddoppia quindi il volume con etere e, dopo nuova agitazione al vortex, si centrifuga (5' a 2000 x g). Lo striscio si esegue, dopo aver scartato il supernatante etereo, utilizzando la parte superficiale, di consistenza gelatinosa, dello strato sottostante. I preparati dei vari materiali, una volta strisciati, vengono lasciati asciugare all'aria e quindi fissati passandoli rapidamente sulla fiamma di un becco Bunsen.

Colorazione di Ziehl-Neelsen

E' la più classica delle metodiche per mettere in evidenza l'alcool-acido resistenza; essa prevede la colorazione con fucsina a caldo [46]. Reagenti:
a) Carbolfucsina: 1 volume di soluzione satura di fucsina basica (3 g in 100 ml di etanolo al 95%) + 10 volumi di soluzione acquosa di fenolo al 5%.
b) Acido solforico al 20%.
c) Etanolo al 95%.
d) Colorante di contrasto: blu di metilene allo 0,3% in soluzione acquosa.
Procedimento: 1) Dopo aver coperto il vetrino con carbolfucsina riscaldare inferiormente con la fiamma di un becco Bunsen fino ad avere sviluppo di vapori; lasciare agire il colorante per 5'.
2) Dopo aver scolato via la fucsina coprire il vetrino con acido solforico (90").
3) Sciacquare il preparato con alcool (30").
4) Lavare il vetrino con acqua di fonte e coprirlo col colorante di contrasto per 5'.
5) Sciacquare e lasciare asciugare all'aria.
Lettura: I vetrini vengono osservati al microscopio, in immersione con un ingrandimento di 1000x: i bacilli alcool-acido resistenti si presentano colorati in rosso, lo sfondo appare invece blu (fig. 7).

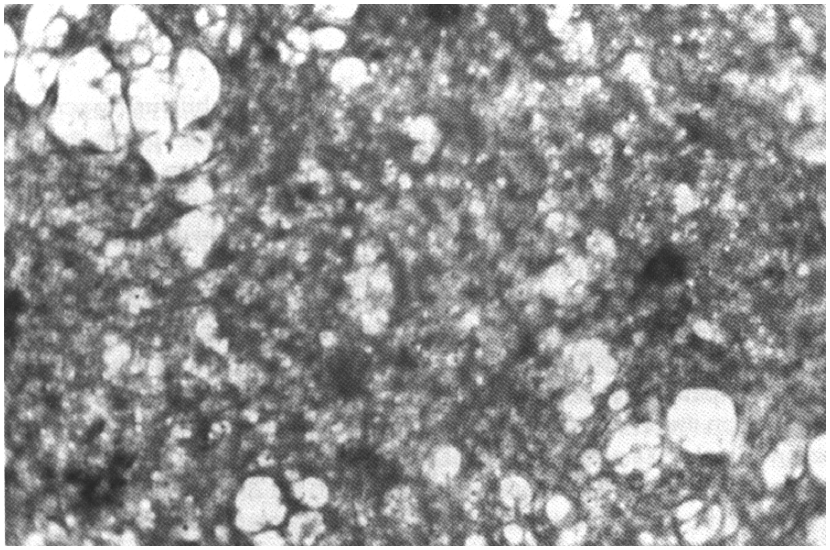


Figura 7. Micobatteri alcool-acido resistenti nell'escreato, colorazione di Zehl-Neelsen (1000x, microscopia ad immersione).

Microscopia in fluorescenza

Il fenomeno della alcool-acido resistenza è alla base anche della microscopia in fluorescenza; in questo caso è il fluorocromo che dopo aver colorato i micobatteri non viene da questi rilasciato nonostante il trattamento con alcool ed acidi [50]. Reagenti:
a) Fluorocromo: 0,1 g di Auramina-O in 10 ml di etanolo al 95%; 3 ml di fenolo liquido in 87 ml di H_2O; le due soluzioni devono essere unite e la miscela conservata al buio.
b) Decolorante: 0,5 ml di HCl concentrato in 100 ml di etanolo al 70%.
c) Permanganato di K allo 0,5% in soluzione acquosa.
Procedimento: a) Coprire il vetrino, preventivamente fissato, con la soluzione di auramina (dopo averla ben agitata) e lasciarvela agire per 15'.
b) Sciacquare con acqua di fonte, scolare e trattare con decolorante per 2'.
c) Sciacquare con acqua di fonte, scolare e coprire il vetrino con $KMnO_4$ (2') per attenuare eventuali fluorescenze aspecifiche.
d) Sciacquare e lasciare asciugare all'aria.
Lettura: Osservare i preparati con un microscopio per fluorescenza a luce blu (lunghezza d'onda media di eccitazione 460 nm); senza usare l'olio sul condensatore. Gli eventuali bacilli alcool-acido resistenti appaiono fluorescenti in giallo contro lo sfondo scuro (fig. 8). Lo screening può essere fatto ad un ingrandimento di 400x o inferiore; assai utile si rivela, in caso di presenza di corpi fluorescenti di dubbia interpretazione, la disponibilità di un obiettivo ad immersione ad ingrandimento superiore. La fluorescenza risulta vantaggiosa, rispetto alla colorazione di Ziehl-Neelsen, per la rapidità di lettura consentita dalla maggiore ampiezza del campo di osservazione microscopica, e per la scarsa rilevanza che assume la sensibilità cromatica dell'osservatore. E' possibile sovraccolorare con lo Ziehl-Neelsen un vetrino già trattato con auramina quando si ritenga che possa essere di aiuto nell'interpretare eventuali corpi fluorescenti dalla morfologia non proprio tipica.

Figura 8. Micobatteri alcool-acido resistenti, colorazione in fluorescenza (400x).

Colorazione di Kinyoun

La colorazione di Kinyoun è assai simile a quella di Ziehl-Neelsen rispetto alla quale presenta il vantaggio di non richiedere riscaldamento [23].
Reagenti: a) Carbolfucsina: fucsina basica 4 g, fenolo 8 g, etanolo al 95% 20 ml, H_2O 100 ml.
b) Decolorante: HCl concentrato 3 ml, etanolo al 95% 97 ml.
c) Colorante di contrasto: verde malachite (8 g in 100 ml di etanolo al 95%) diluito 1:10 in H_2O.
Procedimento: a) Coprire il vetrino, preventivamente fissato, con carbolfucsina (3').
b) sciacquare con acqua di fonte e trattare col decolorante per 2'.
c) sciacquare con acqua di fonte e colorare per 30" con verde malachite.
d) sciacquare e lasciare asciugare all'aria.
Lettura: Si osservano i preparati ad immersione (1000x); i bacilli alcool-acido resistenti appaiono colorati in rosso su uno sfondo verde.

Refertazione

E' buona norma dare nella risposta una valutazione semiquantitativa indicando con + la presenza di sporadici bacilli alcool-acido resistenti, con ++ la presenza di bacilli in vari campi microscopici e con +++ il reperto di numerosi bacilli praticamente in tutti i campi osservati. Tali valutazioni possono fornire al clinico utili indicazioni sull'effetto della

terapia, ed in particolare il rilevamento di elevate cariche batteriche, susseguente ad una fase in cui il monitoraggio microscopico aveva segnalato riduzione o assenza di micobatteri, può costituire un importante indice della comparsa di resistenze. E' forse utile ricordare che il risultato negativo di un esame batterioscopico non è assolutamente interpretabile come negatività certa; si calcola infatti che il limite di sensibilità delle metodiche microscopiche attuali sia di circa $5x10^4$ bacilli per ml di materiale. Per contro un referto positivo non equivale tout court ad una diagnosi di tubercolosi dato che l'esame microscopico si limita ad evidenziare esclusivamente la presenza di bacilli alcool-acido resistenti (ed è in tali termini che deve essere data la risposta), definizione che può essere considerata sinonima di micobatteri ma non necessariamente di *M. tuberculosis*.

Esame colturale

I terreni di coltura

I terreni di coltura per micobatteri, essendo tali microorganismi particolarmente esigenti, sono tutti piuttosto complessi. I terreni liquidi sono generalmente inadatti all'isolamento dei micobatteri da campioni biologici. Possono essere eccezionalmente impiegati per la semina di materiali solitamente sterili come liquor, sangue, liquidi cavitari, ma è soprattutto nell'arricchimento di colture pure e nella preparazione di sospensioni micobatteriche da utilizzare nelle prove di sensibilità o di tipizzazione che essi trovano un certo impiego. Quelli di uso più comune sono il brodo Dubos (da addizionare con albumina o siero) ed il brodo Middlebrook 7H9 che richiede l'aggiunta di Tween 80 o glicerina. Un terreno liquido particolare è il brodo Middlebrook 7H12 che viene utilizzato esclusivamente nelle colture eseguite col metodo radiometrico (v. pag. 47). Fra i terreni solidi, praticamente i soli impiegati per l'isolamento primario, si distinguono quelli a base di uovo e quelli sintetici, entrambi i tipi possono essere resi selettivi grazie all'aggiunta di antibiotici. I terreni a base di uovo soddisfano le esigenze nutrizionali dei micobatteri grazie alla presenza di sostanze naturali: oltre all'uovo stesso, fecola di patate, glicerolo, sali minerali (ed anche latte e patata nel terreno di Petragnani); l'aggiunta di verde malachite ha invece la funzione di inibire lo sviluppo dell'eventuale flora associata sopravvissuta alla decontaminazione. Fra le varie formulazioni esistenti (American Thoracic Society medium, terreno di Petragnani, Lowenstein medium, International Union Tuberculosis Medium) la più usata è la modificazione secondo Jensen del terreno di Lowenstein (Lowenstein-Jensen) che utilizza una concentrazione di verde malachite di 0,25 mg/ml, intermedia fra quella del terreno di Petragnani (0,52 mg/ml) e quella del A.T.S. medium (0,2 mg/ml), e tale da garantire un soddisfacente effetto inibitorio sulla flora contaminante senza essere lesiva sui micobatteri. Largamente impiegato è anche il I.U.T.Medium che si differenzia dal Lowenstein-Jensen per la composizione salina e per l'assenza di fecola di patate. La sostituzione, in un terreno all'uovo, del glicerolo col piruvato, come fonte di carbonio, risulta particolarmente idonea allo sviluppo del *M. bovis*; uno dei più noti terreni di questo tipo è lo Stonebrink medium. Nei terreni sintetici i costituenti fondamentali sono l'agar e l'acido

oleico. Delle due formulazioni di Middlebrook 7H10 e 7H11 la seconda si fa preferire per la presenza di idrolisato di caseina (0,1%) che favorisce la crescita degli stipiti di *M. tuberculosis* resistenti all'isoniazide. I terreni sintetici, essendo trasparenti, risultano particolarmente idonei, se preparati in piastra, all'osservazione microscopica della morfologia delle colonie ed all'individuazione precoce delle colture miste. Molto impiegati sono inoltre, addizionati con i singoli agenti antimicobatterici, per l'esecuzione del test di sensibilità. Indispensabile è per i terreni a base di agar l'incubazione in atmosfera arricchita con il 5-10% di CO_2. Fra i terreni selettivi occorre distinguere quelli addizionati con antimicrobici attivi esclusivamente sulla flora aspecifica, da quelli, usati nei tests di identificazione, contenenti sostanze (NaCl, TCH, ecc.) ad azione inibitoria su particolari specie di micobatteri. Del primo gruppo fanno parte il Lowenstein-Jensen-Gruft, contenente acido nalidixico e penicillina, il Lowenstein-Jensen-Mycobactosel (BBL) contenente cicloeximide, lincomicina ed acido nalidixico, ed i vari: Lowenstein-Jensen, 7H11 e 7H12 (brodo impiegato nel sistema radiometrico), addizionati con la miscela PACT (polimixina, amfotericina B, carbenicillina e trimetoprim). Tutti i terreni descritti si trovano in commercio sia già pronti in provetta sia come basi disidratate alle quali si affiancano i relativi arricchimenti.

Trattamenti preliminari

L'esame colturale per micobatteri presenta delle peculiarità, estranee alla batteriologia comune, legate alla lentezza con cui tali germi crescono sui terreni di coltura. Il divario di ritmo moltiplicativo esistente fra i micobatteri e l'eventuale flora associata è infatti tale che la presenza di quest'ultima, sia pur costituita da specie non particolarmente invasive ed a carica microbica ridotta, finisce regolarmente con lo sfruttare completamente tutta la superficie di terreno a disposizione ben prima che le colonie dei micobatteri, ivi comprese anche le specie a crescita più rapida, possano raggiungere dimensioni tali da poter essere apprezzate. Ne consegue che la coltivazione dei micobatteri è possibile solo a condizione che questi si trovino in coltura pura (eventualità limitata in pratica solo a materiali particolari quali liquor, liquidi cavitari, sangue) o che a tale condizione possano essere ricondotti artificialmente (decontaminazione). In aggiunta a ciò, l'escreato, che costituisce oltre il 75% dei campioni per la ricerca dei micobatteri, necessita, per la sua natura, di un trattamento preventivo atto a renderlo fluido ed omogeneo, la fluidificazione appunto.

La fluidificazione

Molti reagenti impiegati per la decontaminazione svolgono sull'escreato anche azione fluidificante; in altre metodiche invece al decontaminante è affiancato un fluidificante. Nel caso in cui la fluidificazione debba essere eseguita preventivamente si usano sostanze capaci di scindere i legami che conferiscono stabilità alla matrice mucosa dell'escreato.
Reagenti: N-acetil-L-cisteina al 1,5% o ditiotreitolo allo 0,1%. Il loro meccanismo di azione è essenzialmente quello della riduzione dei ponti disolfuro (-S-S-) a radicali -SH.

Procedimento: Normalmente il fluidificante si impiega in parti uguali con l'escreato (direttamente nel contenitore di raccolta) e si lascia agire a 37° C per 15-30'a seconda della consistenza del materiale, in qualche caso possono essere necessarie una o più agitazioni al vortex.

La decontaminazione

I decontaminanti. Il decontaminante ideale è una sostanza dotata di attività antibatterica su tutta la flora associata e del tutto priva di lesività nei confronti dei micobatteri. Una tale sostanza ovviamente non esiste e spetta quindi al microbiologo scegliere fra i decontaminanti disponibili quello più idoneo alle proprie esigenze. Si tratta, nella maggior parte dei casi, di tenere sotto controllo la percentuale degli inquinamenti permettendo nel contempo lo sviluppo del maggior numero di micobatteri possibile, ma può essere, in casi particolari, necessario privilegiare l'uno o l'altro di tali aspetti (come nel caso delle feci, per le quali è indispensabile una decontaminazione energica, o, nel caso di materiali a contaminazione ridotta o assente nei quali è fondamentale riuscire a coltivare qualcuno dei pochissimi, se non addirittura l'unico, micobatterio presente). Se quindi tassi di inquinamento superiori al 5% non possono essere tollerati, è anche vero che la mancanza pressochè totale di colture contaminate dovrebbe far riflettere sull'opportunità di una verifica della lesività del decontaminante impiegato. Tralasciando per il momento le due metodiche che saranno successivamente descritte in dettaglio, elenchiamo alcuni fra i decontaminanti di più largo impiego.
a) NaOH al 4%. Può essere considerato (tecnica di Petroff [49]) il capostipite dei procedimenti di decontaminazione (svolge anche azione fluidificante); ormai non più usato a causa dell'elevata lesività sui micobatteri.
b) H_2SO_4 al 4%. E' eccessivamente lesivo per i micobatteri.
c) Acido ossalico al 5% [11]. Il suo impiego è giustificato solo per materiali fortemente contaminati da *Pseudomonas aeruginosa* essendo assai lesivo per i micobatteri.
d) Cloruro di cetilpiridinio + NaCl al 2%. Ha attività decontaminante moderata, è utile soprattutto per la conservazione (svariati giorni) dei materiali patologici durante la loro spedizione al laboratorio [57].
e) Fosfato trisodico al 25% + cloruro di benzalconio allo 0,3% [26]. Decontamina e fluidifica al tempo stesso, la lesività sui micobatteri è ridotta e le contaminazioni risultano contenute. E' sconsigliabile quando è prevista la semina su terreni a base di agar.
f) Fosfato trisodico allo 0,03% + NaOH allo 0,05% + di isobutil-naftalina-sulfonato allo 0,03% (Nekal BX, Biotest). L'attività decontaminante è molto buona, media la lesività sui micobatteri [65]. La manualità è assai semplice (svolge anche azione fluidificante), il prodotto del commercio è accompagnato da un secondo reattivo che facilita la sedimentazione dei micobatteri rendendo superflua la centrifugazione. E' particolarmente indicato per il trattamento di materiali pesantemente contaminati.
Decontaminazione con acetil-cisteina e NaOH. Il sistema con NaOH secondo Kubica e coll. [28] può essere considerato il metodo di riferimento per la coltura dei micobatteri (fig. 9).

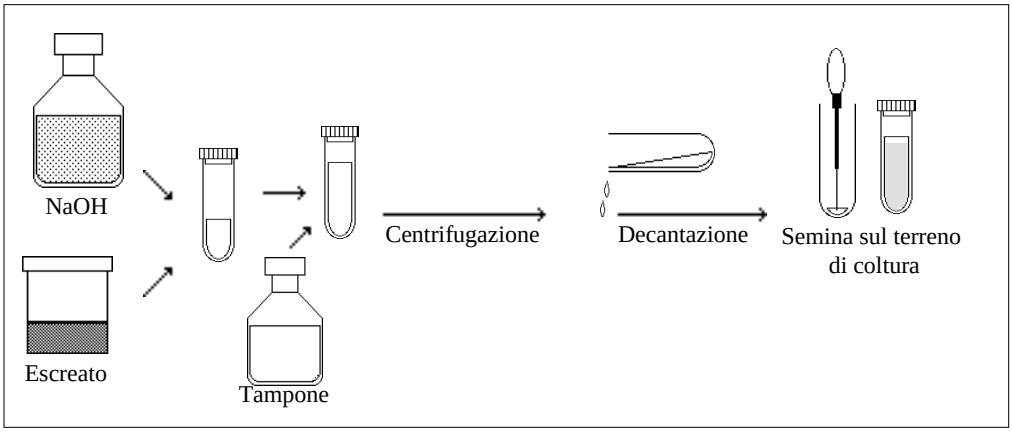


Figura 9. Decontaminazione con NaOH/Acetil-cisteina.

Reagenti: a) Miscela decontaminante-fluidificante composta in parti uguali da citrato trisodico tri-idrato al 2,94% (soluzione 0,1M) e da NaOH al 4%, a cui deve essere aggiunta al momento dell'uso N acetil-L-cisteina in polvere in ragione dello 0,5%. La miscela è stabile per 48 h se conservata in frigorifero.
b) Tampone fosfato 0,067M a pH 6,8.
c) Soluzione sterile al 2% di albumina bovina (frazione V) a pH 6,8.
Procedimento: a) Trasferire il materiale (non più di 10 ml) in un provettone da centrifuga da 50 ml ed aggiungervi un ugual volume di miscela decontaminante-fluidificante.
b) Fluidificare il materiale agitando al vortex per non più di 30".
c) Incubare per 15' a temperatura ambiente agitando di tanto in tanto se la fluidificazione è incompleta.
d) Riempire il provettone con tampone neutralizzando così il decontaminante.
e) Centrifugare per 15' a 2500 x g.
f) Decantare il supernatante e riprendere il sedimento con 1 ml della soluzione di albumina; usare tale sospensione per inoculare i terreni di coltura (3 gocce su ciascun terreno). Può essere utile seminare anche un terreno utilizzando una diluizione 1:10 della sospensione di inoculo.

Decontaminazione con cloruro di dodecil-di(β-ossietil)benzil ammonio. Si tratta di una metodica che rientra nel gruppo di quelle che utilizzano come decontaminante un sale di ammonio quaternario. Essa richiede, limitatamente agli escreati, una fluidificazione preliminare che può essere eseguita indifferentemente con ditiotreitolo o acetil-cisteina (v. pag. 25).
Reagente: Decontaminante: soluzione allo 0,2% di cloruro di dodecil-di(β-ossietil)benzilammonio (Bactofen, Geigy), in tampone fosfato a pH 6,8.
Procedimento: a) Aggiungere, dentro il contenitore stesso di raccolta, un quantitativo didecontaminante equivalente a quello del materiale (tenendo conto, se si tratta di

escreato, del raddoppio di volume dovuto all'aggiunta del fluidificante) ed incubare per 2 h a 37°C.

b) Prelevare 1 ml pescando sul fondo del contenitore ed inoculare una coppia di terreni all'uovo (0,5 ml per ciascuno). Si tratta, come si può vedere, di una metodica estremamente semplificata, in cui tutte le operazioni (travaso, centrifugazione) che possono costituire un rischio per l'operatore sono state eliminate e che tuttavia, paragonata con altri sistemi più indaginosi, non ha evidenziato carenze a livello della sensibilità [7, 62,64]. Come tutte le metodiche che impiegano derivati di ammonio quaternario, mal si concilia con l'utilizzo di terreni a base di agar. Mentre infatti su terreni all'uovo il decontaminante viene neutralizzato dalla lecitina, sui terreni sintetici tale neutralizzazione non si verifica e ciò può comportare un certo effetto lesivo sui micobatteri.

Trattamento di materiali particolari

Tutti i materiali, ad eccezione di pochi casi particolari (liquor, sangue, liquidi cavitari) devono, analogamente agli escreati, essere decontaminati prima della semina. Si riportano di seguito alcuni accorgimenti tecnici utili per una corretta esecuzione dell'esame colturale.

a) Per la semina dei bronco-aspirati (come per l'allestimento del relativo preparato microscopico) è preferibile utilizzare il sedimento ottenuto per centrifugazione (15' a 2000 x g).

b) Con i materiali prelevati mediante tampone è assai difficile ottenere colture positive, sia per la scarsità del materiale solitamente raccolto con tale metodo, sia per la difficoltà di recuperare, a causa dell'idrofobicità della loro parete cellulare, gli eventuali micobatteri imbrigliati fra le fibre dell'ovatta. I risultati migliori si ottengono incubando l'estremità del tampone a contatto con la superficie del terreno di coltura; in tal modo l'eventuale crescita si sviluppa dapprima fra le fibre del tampone per interessare poi anche il terreno. Disponendo di più di un tampone può essere utile, se il prelievo è stato effettuato da lesioni superficiali, incubare anche un terreno a 30°C per favorire la crescita dei micobatteri termosensibili (*M. marinum, M. ulcerans*).

c) I frammenti bioptici devono essere sminuzzati e pestati in un mortaio con sabbia di quarzo sterile; per la semina si utilizza il filtrato attraverso garza.

d) I liquidi cavitari vengono generalmente seminati dopo centrifugazione. Dato che il peso specifico dei micobatteri è assai vicino a quello della matrice liquida può risultare utile diluire il campione con soluzione fisiologica abbassando così il peso specifico del liquido e favorendo la sedimentazione delle cellule micobatteriche.

e) Per la semina del liquido cefalo-rachidiano è consigliabile, oltre all'utilizzo del sedimento ottenuto mediante centrifugazione, la filtrazione. Con il filtro, opportunamente frammentato, possono poi essere insemenzati vari tipi di terreni sia solidi che liquidi. Per il liquor, analogamente ai liquidi cavitari, la decontaminazione non è generalmente necessaria ma, se il quantitativo è sufficiente, può essere utile la semina su una doppia serie di terreni: prima e dopo decontaminazione.

f) Per le emocolture è raccomandabile il prelievo con le provette Isolator contenenti, fra l'altro, saponina (un lisante cellulare che permette la liberazione dei bacilli intraleucocitari) ed un inibitore di complemento e lisozima. Una centrifugazione di 30', ad

angolo fisso di 35° permette la concentrazione dei bacilli per la successiva semina.
g) Il sangue mestruale, una volta prelevato con una pipetta Pasteur in plastica, può essere travasato in una provetta Isolator. Dopo il trattamento descritto in precedenza occorre procedere alla decontaminazione del sedimento.
h) Per l'urinocoltura la decontaminazione deve essere preceduta dalla concentrazione. Questa può essere ottenuta mediante centrifugazione o per filtrazione; è anche possibile abbinare le due tecniche filtrando (membrana Millipore da 0,45 μm) il supernatante ottenuto dalla centrifugazione ed unendo poi al sedimento il residuo raccolto sulla membrana (fig. 10).

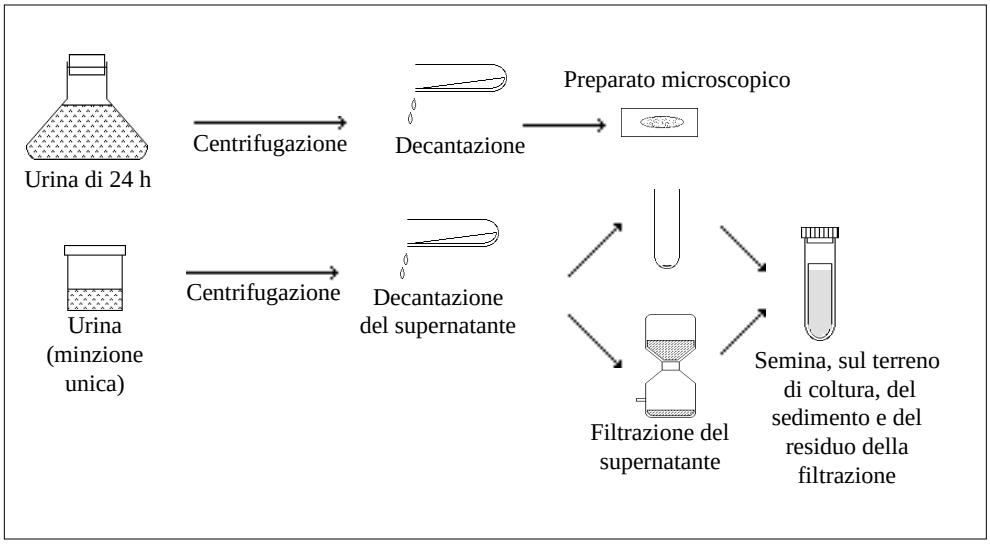


Figura 10. Trattamento delle urine, esame batterioscopico e colturale.

i) Per le feci, trattandosi di materiale fortemente contaminato, è indispensabile un trattamento decontaminante piuttosto energico (buoni risultati si ottengono con il Nekal BX, Biotest) abbinato all'impiego, per la semina, di terreni selettivi (Lowenstein-Jensen con PACT).

La coltura

L'incubazione

Dopo la semina i terreni a becco di clarino devono essere incubati per qualche giorno in posizione inclinata in modo che la sospensione di inoculo ne ricopra per intero la superficie, il tappo allentato permetterà l'evaporazione della fase liquida facendo sì che gli eventuali bacilli ivi sospesi vengano a depositarsi sulla superficie del medium. Successivamente i tubi possono essere incubati in posizione verticale. L'atmosfera

arricchita con CO_2 ha effetto stimolante sulla crescita dei micobatteri; mentre tuttavia i terreni a base di uovo possono essere incubati anche in atmosfera aerobia, la presenza di CO_2 a concentrazione del 5-10% è indispensabile per le colture su terreni sintetici. La durata dell'incubazione può variare dalle 6 alle 10 settimane; può essere utile fissare una prima scadenza, per esempio a 6 settimane, prolungando poi ulteriormente l'incubazione delle colture per cui esistano motivazioni particolari (semina su terreni selettivi, decontaminazione energica, sospetto di micobatteri a crescita particolarmente lenta). Per i materiali prelevati da ulcere cutanee è consigliabile l'incubazione di almeno un terreno a 30° C, optimum di temperatura per specie quali *M. marinum, M. ulcerans* che possono essere responsabili di tale tipo di lesione.

Lettura e refertazione

La prima lettura si effettua al momento del trasferimento delle provette dalla posizione inclinata a quella verticale ed è in tale occasione che per lo più si evidenziano le colture contaminate. Si procede quindi, con cadenza settimanale, all'esame di tutte le colture in corso, il che permetterà di rilevare tempestivamente, oltre ad eventuali ulteriori inquinamenti, le positivizzazioni. Per tutti i terreni rimanenti si esegue, alla scadenza fissata, la lettura finale. Le possibili risposte sono:
a) Negativa, che viene data soltanto alla scadenza naturale dell'incubazione;
b) Contaminazione, da segnalare non appena si manifesta;
c) Positiva, che deve essere sempre preceduta dall'accertamento della alcool-acido resistenza dei bacilli costituenti le colonie. Normalmente i risultati degli esami microscopico e colturale concordano ma non sono rari i casi in cui alla positività del primo si associa negatività del secondo o viceversa. Se si escludono gli errori grossolani, ciò può essere dovuto, in un caso, alla presenza di bacilli non vitali (non infrequenti in pazienti sotto terapia) o all'impiego di una decontaminazione lesiva, e, nel caso opposto, all'esigua carica micobatterica del campione.

La prova biologica

L'esecuzione della prova biologica, consistente nell'inoculazione sottocutanea nella cavia (regione inguinale), del materiale in esame, è al giorno d'oggi caduta totalmente in disuso. Il vantaggio, almeno teorico, della prova biologica era costituito dalla possibilità di impiegare, sul campione biologico, una decontaminazione assai blanda lasciando poi al sistema immunitario dell'animale il compito di eliminare l'eventuale flora contaminante residua. La disponibilità odierna di decontaminanti a lesività limitata ha notevolmente ridotto l'importanza di tale vantaggio che, per giunta, è ormai totalmente annullato dalla ridotta recettività della cavia ad alcuni ceppi di micobatteri. Infatti, oltre ai MOTT, ai quali normalmente l'animale è refrattario, anche i ceppi di *M. tuberculosis* resistenti all'isoniazide ed alla rifampicina presentano per la cavia una patogenicità assai ridotta se non addirittura assente.

L'identificazione

Speciazione

Già al momento in cui una coltura si positivizza sono disponibili importanti informazioni sullo stipite: il tipo di materiale da cui è stato ottenuto l'isolamento, la temperatura e la velocità di crescita della coltura primaria, la morfologia e l'eventuale pigmentazione delle colonie. L'esecuzione di un preparato microscopico è fondamentale per confermare, mettendo in evidenza l'alcool-acido resistenza, l'appartenenza al genere *Mycobacterium* e la purezza della coltura. In caso di colture miste (tenendo tuttavia presente che anche nell'ambito delle cellule di una stessa colonia possono esistere variabilità di alcool-acido resistenza) è indispensabile l'esecuzione dell'isolamento ricorrendo, se necessario, anche alla decontaminazione (v. pag. 26). Per l'identificazione è necessaria l'esecuzione di un certo numero di prove; nel caso del *M. tuberculosis* (che da solo costituisce oltre il 95% degli isolamenti di micobatteri) sono generalmente ritenuti sufficienti i tests della niacina, dei nitrati e della termoinattivazione catalasica.

Produzione di niacina

E' il test di riferimento per l'identificazione di *M. tuberculosis* che possiede la caratteristica di liberare nel terreno rilevanti quantità di acido nicotinico (niacina). Risultano anche positivi a tale test il *M. simiae* (che, oltre che essere estremamente raro, è facilmente distinguibile perché fotocromogeno) ed alcuni ceppi di *M. africanum*.
Reagenti: Alla tecnica tradizionale [24] che utilizza reagenti altamente tossici (bromuro di cianogeno al 10% e benzidina al 4%) si sono andati ultimamente sostituendo due prodotti del commercio: le cartine cromogene TB Niacin test strips (Difco) [80] ed il INH test strips (Difco; destinato in realtà al rilevamento della presenza di acido isonicotinico nelle urine) [36]. Pur essendo entrambi validi, il primo ci pare, utilizzando la metodica modificata che segue, preferibile per praticità, sensibilità e facilità di interpretazione.
Procedimento: La metodica convenzionale consiglia di eseguire il test su colture, in terreno all'uovo, piuttosto vecchie (di almeno 6 settimane) che siano state tenute ben aerate (tappo allentato) durante l'incubazione; con le cartine cromogene si ottengono buoni risultati anche su colture di sole 3-4 settimane, a condizione che la crescita sia rigogliosa. Dopo aver sforacchiato il terreno con la punta di una pipetta Pasteur in modo da aumentare la superficie di estrazione, aggiungere al provettone 2-3 ml di H_2O e incubare il tutto a 37°C in posizione inclinata in modo che il liquido ricopra per intero la superficie del medium. Dopo un contatto di qualche ora (o meglio overnight) lasciare che l'estratto acquoso si raccolga tutto sul fondo del tubo tenuto per pochi minuti in posizione verticale, e distribuirlo poi in due provette in una delle quali viene introdotta la cartina cromogena mentre l'altra servirà da bianco (fig. 11).

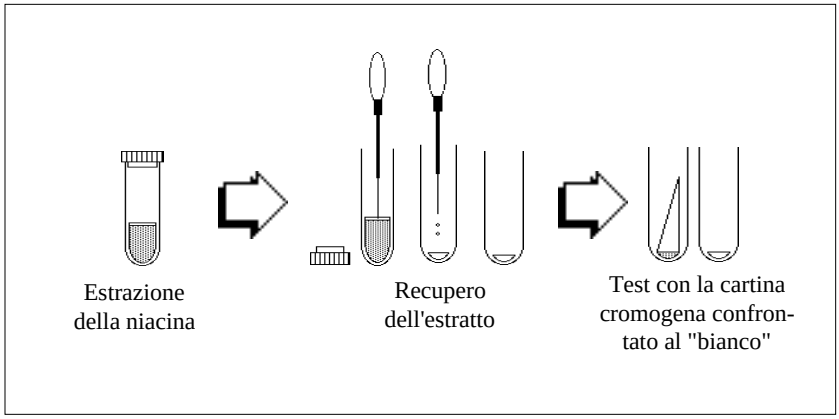


Figura 11. Test della niacina.

Lettura: Si considera positivo ogni rilevante viraggio al giallo della fase liquida, rapportato al bianco.
Controlli: Come controllo positivo si può usare l'estratto di un ceppo di *M. tuberculosis*, il controllo negativo non è necessario.

Riduzione dei nitrati

Molte specie di micobatteri, fra cui il *M. tuberculosis* possiedono una reduttasi che riduce i nitrati a nitriti [70].
Reagenti: a) Substrato: soluzione di $NaNO_3$ 0,01M in tampone fosfato 0,022M (pH 7).
b) Cromogeno: miscela in polvere costituita da 1 parte di acido solfanilico, 1 parte di N-(1-naftil)-etilendiamina dicloridrato, 10 parti di acido L(+)-tartarico [72].
c) Polvere di zinco.
Procedimento: Dopo aver stemperato un'ansata piuttosto abbondante dello stipite in esame in 0,5 ml di H_2O, aggiungervi 2 ml di substrato e incubare il tutto in bagnomaria a 37°C per 4 h. Al termine aggiungere una piccola spatolata di polvere cromogena e rimescolare il tutto accuratamente.
Lettura: Lo sviluppo quasi immediato di qualsiasi colore, fra rosa e rosso intenso, deve essere interpretato come positivo. Tutti i tests negativi (assenza di colorazione) devono essere confermati con l'aggiunta di qualche granello di polvere di zinco. L'attività riducente dello zinco farà infatti virare al rosso tutte le provette in cui sarà ancora presente il substrato di partenza (nitrato) mentre non avrà alcun effetto se il processo di riduzione, dopo aver trasformato il nitrato in nitrito, sarà giunto fino alla liberazione di azoto (falsa negatività).
Controlli: Come controllo positivo si usa il *M. tuberculosis*; come controllo negativo una provetta di substrato non inoculata.

Termoinattivazione della catalasi

Tutte le specie di micobatteri posseggono la catalasi, fanno eccezione alcuni ceppi mutanti, resistenti all'isoniazide, di *M. tuberculosis* (ma anche di *M. kansasii* e di *M. gastri*). L'attività catalasica viene messa in evidenza per mezzo dell'aggiunta di acqua ossigenata da cui l'enzima libera ossigeno [24]. Solo poche specie: *M. tuberculosis* e *M. bovis* (ma anche *M. gastri* e *M. haemophilum*) possiedono una catalasi che viene completamente inattivata dal riscaldamento a 68°C per 20'.
Reagenti: a) Tampone fosfato 0,067M (pH 7).
b) Miscela in parti uguali, preparata al momento della prova, di Tween 80 al 10% in H_2O e di H_2O_2 al 30%.
Procedimento: Stemperare in due provette contenenti 0,5 ml di tampone fosfato, alcune ansate della coltura in esame e incubarne una in bagnomaria a 68°C per 20' mentre l'altra rimane a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, dopo che la prima sospensione si è raffreddata, aggiungere ad entrambe 0,5 ml della miscela contenente H_2O_2 (fig. 12).
Lettura: Lo sviluppo di bollicine con formazione di schiuma sulla superficie del liquido indica presenza di catalasi; questa sarà termoresistente se presente in entrambe le provette, termosensibile se presente solo nella provetta non incubata a 68°C. L'osservazione viene protratta per 20'.

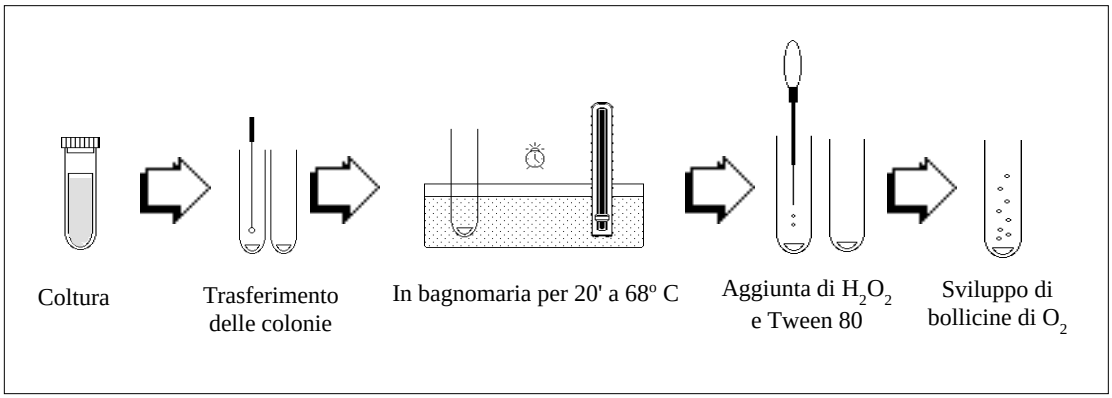


Figura 12. Termoinattivazione della catalasi.

Le prove per la tipizzazione dei MOTT

In tutti i casi in cui lo stipite in esame sia caratterizzato da colonie lisce e/o pigmentate, ovvero cresca in coltura primaria in tempi brevi (<15 gg.) o ancora abbia fornito allo screening costituito dai tests di niacina, nitrati e termoinattivazione della catalasi risultati diversi da quelli caratteristici del *M. tuberculosis*, si rende necessaria l'esecuzione di una serie ulteriore di prove che permettano di giungere ad una speciazione definitiva. Una identificazione precisa è indispensabile per discriminare le specie normalmente patogene da quelle usualmente saprofite; qualora tuttavia lo studio

preliminare di certe caratteristiche faccia escludere l'appartenenza dello stipite ad una specie potenzialmente patogena può essere considerata sufficiente l'attribuzione del medesimo ad un complesso. *M. terrae, M. nonchromogenicum e M. triviale*, ad esempio, che non sono quasi mai associati a malattia, presentano caratteristiche talmente simili fra di loro da poter essere indicati come facenti parte del *M. terrae complex*. In altre circostanze una esatta individuazione di specie non è ottenibile con i metodi tradizionali, è il caso ad esempio di *M. avium* e *M. intracellulare*, per i quali risulta più corretta la identificazione come *M. avium complex* che trova la sua giustificazione, oltre che nella somiglianza delle caratteristiche biochimico-colturali, anche nella sovrapponibilità delle patologie sostenute dalle due specie. Le prove fondamentali possono essere distinte in tests colturali e tests biochimici. I tests colturali permettono di apprezzare velocità e temperatura di crescita oltre che la pigmentazione delle colonie. Ad essi si affiancano le prove di inibizione selettiva che mettono in evidenza la capacità o meno dello stipite in esame di crescere su terreni resi selettivi dall'aggiunta di sostanze quali NaCl, Tb1, TCH o dall'estrema povertà del mezzo (Mac Conkey). I tests biochimici mettono in evidenza varie attività enzimatiche quali ureasi, arilsolfatasi, lipasi (idrolisi del Tween 80), riduzione del tellurito, catalasi.

Tests colturali. E'consigliabile eseguire l'intera batteria di prove in un'unica seduta anche se alcuni tests risulteranno poi inutili, si eviteranno così ritardi al momento di trarre le fila per la refertazione.
Procedimento: Allestire una sospensione dello stipite in esame stemperando in H_2O, in un provettone contenente alcune palline di vetro, varie colonie e agitando piuttosto a lungo al vortex. Da tale sospensione madre, di torbidità non inferiore allo standard McFarland n° 1, preparare una diluizione 1:20 che sarà utilizzata per inoculare (0,2 ml):
a) 4 provette di Lowenstein-Jensen da incubare rispettivamente a 30° C, a 45° C, e le ultime 2 a 37°C dopo averne avvolta una in foglio di alluminio per proteggerla dalla luce [74];
b) 1 terreno contenente 5 µg / ml di idrazide dell'acido tiofen 2-carbossilico (TCH) [75];
c) 1 terreno contenente 10 µg / ml di tiacetazone (Tb1) [75];
d) 1 terreno contenente NaCl al 5% [74];
e) 1 Lowenstein Jensen solidificato a cilindro [75];
f) 1 piastra di 7H11 ed 1 piastra di MacConkey senza cristalvioletto, utilizzando un'ansa calibrata da 10 µl. Buona parte dei terreni suddetti sono reperibili in commercio già pronti; non è comunque complicato prepararli in laboratorio. Tanto più che è fondamentale impiegare sempre terreni freschi.
Lettura: Tutti i terreni suddetti (tranne il tubo di Lowenstein-Jensen incubato al buio) devono essere controllati almeno una volta la settimana. Dopo 7 gg. le indicazioni più importanti si possono ricavare dai terreni di Lowenstein-Jensen a 30° e 37° C, per discriminare gli stipiti a rapida o a lenta crescita; e dalla piastra di 7H11 che, osservata al microscopio, permette di rilevare la morfologia coloniale (è consigliabile ripetere frequentemente tale osservazione per seguire l'evoluzione nel tempo della struttura delle colonie). Alle successive scadenze settimanali è bene confrontare lo sviluppo batterico alle varie temperature di crescita (se le colonie più rigogliose, o addirittura le

uniche, sono quelle cresciute a 30° C è bene ripetere l'intero set di prove incubandolo a tale temperatura). La lettura dopo 14 gg. (presenza o assenza di crescita) è da considerare definitiva per il terreno MacConkey; quella dopo 4 settimane per il NaCl medium. La provetta avvolta nel foglio di alluminio verrà osservata solo dopo che sul Lowenstein-Jensen di controllo incubato a 37° C si sarà sviluppata una crescita rigogliosa; in presenza di colonie pigmentate lo stipite sarà da considerare scotocromogeno; qualora invece il pigmento sia assente occorrerà esporre il terreno, col tappo allentato, alla luce di una lampada da 100 W, alla distanza di 20-30 cm, per un tempo di 3-5 h. Dopo una successiva reincubazione a 37° C, per ulteriori 24-48 h, la lettura definitiva permetterà di individuare i ceppi fotocromogeni in base al pigmento comparso nel frattempo. La colture sui terreni contenenti Tb1 e TCH saranno da considerare positive solo nel caso che l'eventuale sviluppo di colonie non sia inferiore al 1% di quello avutosi sul Lowenstain-Jensen di controllo; la lettura di quelle negative dovrà invece essere eseguita dopo almeno 21 gg. dalla comparsa di crescita sul terreno di controllo suddetto.

Tests biochimici. - Test dell'ureasi. Il test dell'ureasi può essere di aiuto nell'identificazione di stipiti batterici con caratteristiche anomale: permette infatti di discriminare gli occasionali ceppi pigmentati di *M. avium/intracellulare* (negativi) dal *M. scrofulaceum* (positivo) o, ad esempio, gli isolati poliresistenti di *M. bovis* (positivi) dallo stesso *M. avium/intracellulare*.
Reagenti: Il substrato è costituito da Urea agar base concentrated (Difco) diluita 1:10 con H_2O sterile e distribuita in aliquote di 4 ml [24].
Procedimento: Stemperare 2 o 3 ansate di coltura micobatterica in una provetta di substrato da incubare a 37° C per 3 gg.
Lettura: La comparsa, entro 3 gg., di colore che può andare dall'ambra al rosa, fino al rosso (dovuto al viraggio dell'indicatore rosso-fenolo presente nel mezzo), indica idrolisi del substrato da parte dell'enzima.
Controlli: Si possono usare, come controllo positivo, un ceppo di *M. kansasii* e, come controllo negativo, il *M. gordonae*.
- Test dell'arilsolfatasi. La prova dell'arilsolfatasi permette di differenziare, all'interno del IV gruppo, le specie patogene (positive entro 3 gg.) da quelle saprofite.
Reagenti: a) Substrato: si prepara aggiungendo a 100 ml di Dubos oleic agar base fuso, 1 ml di glicerolo e 65 mg di fenolftaleina disolfato tripotassica (BDH Chemicals) il tutto da distribuire in provette in aliquote da 2 ml [34].
b) Reattivo rivelatore della reazione: Na_2CO_3 1M.
Procedimento: Aggiungere al terreno una goccia di una sospensione bacillare ed incubare a 37° C.
Lettura: Il test è positivo se aggiungendo, dopo 3 gg., 1 ml di Na_2CO_3 il liquido vira al rosa per la presenza di fenolftaleina libera.
Controlli: Si usano come controllo negativo un ceppo appartenente al *M. avium complex* e come controllo positivo uno stipite di *M. fortuitum*. La prova può essere eseguita anchesu specie a crescita lenta ma in questo caso la lettura deve essere effettuata dopo 14 gg.

- Idrolisi del Tween 80. L'idrolisi del Tween 80 (derivato polietilenico del mono-oleato di sorbitolo), indotta dalla presenza di una lipasi, permette di differenziare all'interno del II e del III gruppo di Runyon le specie clinicamente significative (negative) da quelle usualmente saprofite (positive in 5 gg.). Fanno eccezione a questa regola due patogeni emergenti: *M. malmoense* e *M. szulgai*, negativi al 5° giorno ma debolmente positivi dopo 2 settimane. Il test può inoltre fornire un'importante conferma dell'identificazione del *M. kansasii* caratterizzato da forte positività.
Reagenti: La preparazione del substrato è piuttosto complessa [24], assai pratico è l'impiego del reattivo TB Hydrolysis reagent (Difco) costituito da una soluzione tamponata di Tween 80 complessato con rosso neutro [22].
Procedimento: Dopo aver preparato una sospensione dello stipite in esame in 1 ml di H_2O sterile aggiungervi 2 gocce di reagente ed incubare il tutto al buio a 37° C.
Lettura: Osservare la provetta dopo 5 e 10 gg. per notare l'eventuale passaggio del colore del liquido da ambra a rosa / rosso per effetto della liberazione del rosso neutro. Se tale cambiamento interviene entro 5 gg., l'idrolisi è da considerare chiaramente positiva, è dubbia se si verifica fra il 6° ed il 10° giorno, mentre è negativa oltre il 10° giorno.
Controlli: Si usano come controllo negativo il *M. scrofulaceum* e come controllo positivo il *M. kansasii*.
- Riduzione del tellurito. La capacità di ridurre il tellurito di potassio a tellurio metallico in 3 gg. è una caratteristica distintiva del *M. avium complex* e dei micobatteri a rapida crescita; varie altre specie possono mostrare una più o meno debole attività riducente sul tellurito. Reagenti:
a) Soluzione acquosa sterile di K_2TeO_3 allo 0,2% distribuita in piccole aliquote.
b) Brodo Middlebrook 7H9 senza glicerolo né Tween 80 [24].
Procedimento: Dopo aver inoculato una provetta di 7H9 con un paio di ansate dello stipite in esame incubarla a 37° C. Dopo 7 gg., se il brodo è sufficientemente torbido (in caso di crescita scarsa ripetere ex novo il trapianto), aggiungervi 2 gocce della soluzione di tellurito (la parte residua dell'aliquota viene scartata) e proseguire l'incubazione per ulteriori 3 gg.
Lettura: Il test è da considerarsi positivo in presenza di un sedimento nero (tellurio elementare); per evitare problemi di interpretazione è indispensabile che la provetta non sia sottoposta a scosse dopo l'aggiunta del tellurito ed al momento della lettura.
Controlli: Come controllo positivo si usa generalmente uno stipite di *M. avium/intracellulare*, come controllo negativo uno di *M. gordonae* .
- Catalasi semiquantitativa. La produzione di ingenti quantità di catalasi è caratteristica di alcune specie micobatteriche; per altre invece la valutazione quantitativa della catalasi può essere messa in relazione al grado di patogenicità: è il caso del *M. kansasii* in cui i ceppi forti produttori sembrano più spesso associati a malattia che non i deboli produttori.
Reagenti: Miscela in parti uguali di H_20_2 e Tween 80 (al 10% in H_2O), da preparare sul momento.
Procedimento: Utilizzare una provetta di Lowenstein-Jensen solidificato a cilindro, in cui la superficie libera del terreno sia stata inoculata con la sospensione micobatterica in esame, al momento dell'esecuzione delle prove colturali (v. pag. 34),e quindi incubare per 15 gg. a 37° C. Aggiungervi 1 ml. della miscela suddetta.

Lettura: A 5' dall'aggiunta del reattivo misurare l'altezza della colonna di schiuma formatasi nella provetta; il ceppo viene classificato come forte o debole produttore di catalasi a seconda che tale altezza sia superiore o inferiore a 45 mm.
Controlli: Si possono usare un ceppo di *M. kansasii* (>45 mm) ed uno di *M. tuberculosis* (<45 mm).

Prove supplementari. Alle prove appena descritte, che costituiscono il gruppo di test standard da impiegare per l'identificazione dei MOTT, se ne possono aggiungere alcune supplementari utili per dirimere eventuali dubbi. 1) Sensibilità alla ciprofloxacina. Si impiega per discriminare il *M. fortuitum* (sensibile) dal *M. chelonae* (resistente); la prova si esegue utilizzando un terreno con l'antibiotico incorporato [48] o un dischetto di ciprofloxacina su una piastra di Mueller-Hinton insemenzata col metodo Kirby-Bauer, la lettura si esegue dopo 48 h. 2) Sensibilità all'isoniazide (1 mg / ml). La prova permette di differenziare il *M. xenopi* (sensibile) dal *M. avium/intracellulare* (generalmente resistente) [75]. Si utilizza un terreno con il farmaco incorporato seminato in parallelo con un terreno di controllo secondo la metodica usata per l'antimicobatteriogramma (v. pag. 43).

Chiave di identificazione

Il punto critico di tutta l'operazione di speciazione dei micobatteri è rappresentato dalla fase finale in cui si tratta di ricomporre le tessere (costituite dai risultati delle singole prove) per formare il mosaico (identificazione). L'aiuto offerto da apposite tabelle (tab. 2) non è infatti da solo sufficiente a risolvere tutti i problemi, sia perché in tali schemi abbondano i risultati dubbi (stante la grande variabilità dei caratteri dei micobatteri) sia perché è estremamente raro che il pattern dei risultati in esame si adatti perfettamente a quelli considerati tipici della specie di appartenenza. Solo l'esistenza di laboratori specializzati, in cui gli operatori abbiano la possibilità di acquisire un'esperienza sufficiente, può garantire il mantenimento di un adeguato standard qualitativo di identificazione dei micobatteri.

	Niacina	Nitrati	Catalasi	Catalasi a 68° C	Catalasi >45mm	Pigmento al buio	Pigmento alla luce	Tween 5gg	Tween 10gg
M. tuberculosis	+	+	+	-	-	-	-	-/+	V
M.bovis/BCG	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M.africanum	+/-	V	+	-	-	-	-	-	-
M.ulcerans	-	-	+	+	-	-	-	-	-
M.asiaticum	-	-	+	+	+	-	+	+	+
M.kansasii	-	+	+	+	+	-	+	+	+
M.marinum	-	-	+	+	V	-	+	+	+
M.simiae	V	-	+	+	+	-	+/-	-	-
M.flavescens	-	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+
M.gordonae	-	-	+	+	+	+	+	+/-	+
M.scrofulaceum	-	-/+	+	+	+	+	+	-	-
M.szulgai	-	+	+	+	+	+	+	V	+/-
M.xenopi	-	-	+	+	-	+/-	+/-	-	-
M.avium-complex	-	-	+	+/-	-/+	-	-	-	-
M.gastri	-	-	+	-	-	-	-	+	+
M.haemophilum	-	-	V	-	-	-	-	-	-
M.malmoense	-	-	+	V	-	-	-	v	+
M.nonchrromogenicum	-	V	+	+	+	-	-	+	+
M.terrae	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M.triviale	-	+	+	+	+	-	-	+/-	+
M.chelonae	-	-	+	+	+	-	-	-/+	-/+
M.fortuitum	-	+	+	+	+	-	-	V	V
M.phlei	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M.smegmatis	-	+	+	+/-	+/-	-	-	+	+
M.vaccae	-	+/-	+	+	+	V	+	+	+

Tabella 2. Chiave di identificazione dei micobatteri.

Legenda. +: reazione positiva nel 91-100% degli stipiti;
+/-: reazione positiva nel 71-90% degli stipiti;
V: reazione positiva nel 31-70% degli stipiti o reazione non nota;
-/+: reazione negativa nel 71-90% degli stipiti;
-: reazione negativa nel 91-100% degli stipiti;
l: crescita lenta (>7 gg);
r: crescita rapida (< 7 gg);
L: colonie lisce;
R: colonie rugose.

Crescita su NaCl	Velocità crescita	Crescita a 25° C	Crescita a 45° C	Crescita McConkey	Tellurito	Aril-solfat.	Morfol. colonie	Urea	Crescita su TCH	Crescita su Tb1	Crescita su NH_2O	β-glucos.
-	l	-	-	-	-	-	R	+	+	-	-	+
-	l	-	-	-	-	-	R	+	-	-	-	-
-	l	-	-	-	-	-	R	V	+	-	V	V
-	l	+	-	V	-	-	R	-	-	V	V	V
-	l	+	-	V	-	-	V	-	-	V	V	V
-	l	+	-	-	-	-	V	+	+	-	+/-	V
-/+	l	+	-	-	-	-	V	+	+	V	+/-	-
-	l	+	-	V	+/-	-	L	+	+	+	V	-
+	V	+	-/+	-	V	-	L	+	+	+	-/+	-
-	l	+	-	-	-	-	L	-	+	+	V	-
-	l	+	-	-	-	-	L	+	+	-/+	V	-
-	l	+	-	-	V	V	V	+/-	+	+	V	V
-	l	-	+	-	-	V	L	-	+	+	+	-
-	l	V	V	-/+	+/-	-	V	-	+	+	+	-
-	l	+	-	-/+	-	-	V	+	+	-	+	V
-	l	+	-	-	-	-	R	-	V	V	V	V
-	l	+/-	-	V	V	-	L	+/-	+	+	V	V
-	l	+/-	V	-	-	V	V	-	+	+	V	V
-	l	+/-	-	-	-	-	V	-	+	+	+/-	V
+	l	V	V	-	-	-/+	R	-	+	V	V	V
V	r	+/-	-	+	V	+	V	+	+	+	V	-
+	r	+/-	-	+	V	+	V	+	+	+	+	+
+	r	V	+	-	V	-	R	V	V	+	+	V
+	r	+/-	+	-	+/-	-	V	V	V	+	V	V
V	r	V	V	-	V	-	L	V	V	+	V	V

La tassonomia numerica

Ogni volta che identifica un microorganismo in base ai risultati di una serie di prove, il microbiologo non fà altro che scegliere la più probabile fra le varie identificazioni compatibili con il pattern di risultati a sua disposizione. Una tale scelta, che nella maggior parte dei casi è effettuata, quasi inconsapevolmente, in base all'esperienza dell'operatore, può essere anche regolata da rigorosi criteri matematici. E' questo ciò che avviene nella tassonomia numerica che sostituisce all'esperienza del microbiologo una matrice a due entrate (costituite dalle specie che possono essere identificate e dalle prove di identificazione) in cui per tutte le specie è riportata la percentuale di positività corrispondente a ciascuna prova. Questa tabella, che è praticamente il cervello del sistema di identificazione, è costruita elaborando i risultati dei tests identificativi eseguiti su microorganismi di cui si conosce la specie di appartenenza; quanto più elevato sarà il numero dei microorganismi testati per ciascuna specie, tanto più affidabile risulterà la tabella. Volendo identificare un germe sconosciuto, disponendo dei risultati dei tests di identificazione eseguiti su di esso, sarà facile, utilizzando la matrice suddetta, calcolare la probabilità che, per ciascuna prova e successivamente per tutto l'insieme di prove, tale microorganismo ha di appartenere ad ognuna delle specie ivi contemplate. La quantità dei calcoli necessari, ancorchè semplici, è assai elevata tanto che non ne è proponibile l'esecuzione se non ricorrendo ad un elaboratore elettronico. In questi ultimi anni, con la crescente diffusione dei computers anche all'interno dei laboratori di microbiologia, si è assistito ad un continuo fiorire dei sistemi di identificazione (soprattutto per enterobatteri) messi a punto dalle varie Ditte di prodotti diagnostici. La micobatteriologia è rimasta al margine di questa spinta innovatrice probabilmente poiché in questo settore piuttosto specialistico le Ditte non intravedono possibilità di profitto. Si annovera per il momento solo qualche prototipo di programma [27, 63, 77], mentre è verosimile che con il ricorso all'approccio probabilistico, proprio della tassonomia numerica, la speciazione dei micobatteri possa finalmente compiere quel salto di qualità che ha finora trovato il maggior ostacolo nella notevole frequenza con cui si incontrano ceppi devianti, per uno o più caratteri, dallo standard della specie di appartenenza.

Tipizzazione

La tipizzazione, cioè la ricerca, all'interno di una specie di varianti, può essere di grande utilità in studi epidemiologici. La più classica delle tecniche di tipizzazione, l'agglutinazione con antisieri specifici, può essere impiegata anche a livello dei micobatteri [53, 54]. A parte svariati sieri specie-specifici utilizzabili per la conferma della identificazione tassonomica, trovano oggi un certo impiego gli antisieri che permettono il riconoscimento dei sierotipi del *M. avium complex* [21]. La tipizzazione fagica è attualmente quella che permette la miglior definizione dei biotipi del *M. tuberculosis*. Usando un set di 10 batteriofagi è infatti possibile dividere la specie in 8 fagotipi maggiori e 64 minori [18]. Un approccio ancora in fase di studio è quello della tipizzazione biochimica

consistentenell'evidenziare i biovars all'interno di una specie utilizzando come marker il loro corredo enzimatico. Si tratta di una tecnica che, grazie all'impiego di substrati coniugati con un cromogeno, permette di ottenere ottimi risultati anche con microorganismi dal metabolismo torpido quali i micobatteri; i tests non richiedono infatti la moltiplicazione del ceppo essendo sensibili già alle pur minime quantità di enzima presenti nella cellula. Alcune ricerche relative alla specie *M. tuberculosis* sembrano prospettare l'esistenza di almeno 4 biotipi [9].

Antimicobatteriogramma

I farmaci antitubercolari

I farmaci per il trattamento della tubercolosi vengono usualmente divisi in maggiori e minori; fra i primi sono tradizionalmente compresi Isoniazide, Streptomicina, Etambutolo, Rifampicina ed Acido p-aminosalicilico anche se quest'ultimo è ormai quasi unanimemente declassato a "seconda scelta". L'isoniazide è, assieme alla rifampicina, il chemioterapico antitubercolare di maggior rilevanza; esplica attività battericida ed agisce anche a livello intracellulare. Le vie di somministrazione possono essere quella orale e quella intramuscolare. Il farmaco è epatotossico. La streptomicina non è, a differenza dell'isoniazide, di sintesi, bensì estratta da colture di *Streptomyces griseus*; ha attività battericida ma esclusivamente sui bacilli extracellulari. Si somministra per via orale e può risultare ototossica. L'etambutolo è un chemioterapico di sintesi ad attività batteriostatica sui germi sia intra che extra-cellulari. Può essere impiegato sia per via orale che intramuscolo; fra gli effetti collaterali va ricordata la possibile insorgenza di neurite ottica. La rifampicina, ottenuta per semisintesi dalla Rifamicina B (antibiotico estratto da *Streptomyces mediterranei*), è il più efficace dei farmaci antitubercolari. E` dotata di attività battericida, anche a livello intracellulare, che si esplica mediante l'inibizione della trascrizione dal DNA al mRNA. Viene somministrata per via orale e può avere effetto epatotossico. L'acido p-aminosalicilico, chemioterapico di sintesi, ha attività batteriostatica; presenta una discreta tossicità ed ha svariate controindicazioni. I farmaci minori sono in genere assai tossici ed il loro impiego è limitato ai casi in cui si riscontra resistenza agli antitubercolari di prima scelta. Ricorderemo: Capreomicina (batteriostatico), Cicloserina (batteriostatico), Etionamide (battericida) e Viomicina.

I farmaci anti-MOTT

I MOTT sono, rispetto al bacillo di Koch, meno sensibili ai farmaci antitubercolari. Il *M. kansasii* è la specie che presenta meno resistenze essendo per lo più sensibile a tutti i farmaci maggiori. Anche il *M. scrofulaceum* è abbastanza sensibile. in particolare ad etambutolo, rifampicina ed acido p-aminosalicilico. Le altre specie sono invece pluri-resistenti anche se svariate sono quelle sensibili all'etambutolo. Per i micobatteri a rapida crescita si possono usare, previa esecuzione dell'antibiogramma, amikacina,

doxiciclina, minociclina, kanamicina, sulfonamide e trimetoprim [71]. Ancora in fase sperimentale è la ofloxacina che pare dotata di notevole attività nei confronti di varie specie fra cui anche il *M. tuberculosis* [67].

Resistenza primaria e secondaria

I ceppi di micobatterio tubercolare di primo isolamento (o ceppi selvaggi), isolati cioè da soggetti non sottoposti in precedenza a terapia specifica, sono normalmente sensibili a tutti i chemioterapici antitubercolari maggiori. Esistono tuttavia dei microorganismi, la cui frequenza è compresa fra il 5 ed il 15% a seconda delle popolazioni, che possono presentare resistenze ad uno o più di tali farmaci; si parla in questo caso di resistenza primaria. Si definisce invece resistenza secondaria quella che compare in seguito all'instaurazione della terapia. Si tratta di resistenze cromosomiche, per il micobatterio tubercolare non è stata descritta alcuna resistenza di tipo plasmidico, che si manifestano a seguito di mutazioni spontanee. La frequenza di tali mutazioni è estremamente bassa, se ne verifica una ogni circa 108 divisioni cellulari, e necessitano, per affermarsi nell'ambito della popolazione batterica, della pressione selettiva esercitata dalla terapia col farmaco verso cui esse sono dirette. La frequenza delle resistenze secondarie non è uguale in tutti i Paesi; dal momento infatti che la mutazione da cui esse traggono origine non interessa mai più di un antibiotico, queste possono essere normalmente prevenute con l'instaurazione di politerapie antibiotiche che costituiscono ormai la norma nella cura della tubercolosi.

Il saggio della sensibilità

Sistema diretto ed indiretto

La determinazione della sensibilità ai farmaci del micobatterio tubercolare può essere eseguita direttamente (a partire dal materiale patologico) o da coltura. Il primo sistema (metodo diretto) può essere eseguito quando l'esame batterioscopico evidenzia almeno 2-3 bacilli per campo (1000x). In tale caso, dopo aver decontaminato il materiale, occorre centrifugarlo, decantare il supernatante, ed usare il sedimento risospeso in un ugual volume di H_2O, ed una sua diluizione 1:100, per l'esecuzione della prova (in caso di batterioscopico fortemente positivo è consigliabile procedere ad una opportuna prediluizione del sedimento). Quando il metodo diretto non è applicabile occorre attendere lo sviluppo dei micobatteri in coltura ed allestire da questa una sospensione (aggiustata su un idoneo standard turbidimetrico) da usare, intera e diluita 1:100, per l'inoculo. Nell'esecuzione della sensibilità indiretta è fondamentale, per la significatività della prova, avere a disposizione un numero di colonie non troppo basso e che il campionamento risulti il più ampio e rappresentativo possibile.

Il maggior pregio del metodo diretto, a parte la rapidità (si risparmiano almeno una ventina di giorni, necessari per la positivizzazione della coltura), è costituito dalla

appresentatività del campione micobatterico impiegato che rispecchia fedelmente la popolazione infettante. Talvolta tuttavia risulta impossibile portare a termine la prova a causa della decontaminazione del campione, non sempre efficace, o dell'esiguo numero di colonie cresciute sui controlli. Il metodo indiretto è certamente più pulito e, non richiedendo la decontaminazione, non presenta limitazioni per quanto riguarda i terreni impiegabili (v.pag. 28).

Generalità

Il metodo della diffusione [45] (il classico Kirby-Bauer) usato per il saggio della sensibilità di quasi tutte le specie batteriche, non può essere applicato ai micobatteri. La caratteristica lentezza di sviluppo di questi ultimi stravolge infatti completamente l'equilibrio fra crescita microbica e diffusione del farmaco che è alla base di tale metodica. L'alternativa è costituita dall'impiego di terreni con chemioantibiotici incorporati, essa presenta però il non trascurabile inconveniente dell'inattivazione del farmaco, sia in occasione del riscaldamento a 85°C richiesto per la preparazione del terreno all'uovo (di gran lunga il più usato in Italia), sia durante lo stoccaggio. I terreni con antibiotici incorporati sono stati utilizzati dapprima nel metodo delle concentrazioni assolute [44, 68]: una vera e propria determinazione della MIC che richiede però l'impiego di un elevato numero di terreni ed in cui la validità del risultato è pesantemente condizionata dalla maggiore o minore inattivazione del farmaco al momento della prova. Per ovviare a questo inconveniente è stato successivamente introdotto il metodo della "ratio" [5] che prevede l'esecuzione, in parallelo, della prova, oltre che sullo stipite in esame, anche su un ceppo di controllo sicuramente sensibile a tutte le sostanze testate (si usa normalmente il ceppo H37Rv). Il risultato si ottiene rapportando il numero delle colonie del ceppo in esame a quelle dello stipite di controllo cresciute su terreni equivalenti. Tale rapporto viene poi confrontato con la ratio critica di ciascun farmaco per l'interpretazione come sensibile o resistente.

Metodo delle proporzioni

La determinazione della sensibilità dei micobatteri mediante il metodo delle proporzioni, qualsiasi siano la metodica ed i terreni impiegati, si basa sull'osservazione clinica che quando in una popolazione micobatterica la percentuale dei bacilli resistenti ad un determinato farmaco supera l'1% ben presto tale percentuale si eleva considerevolmente e la terapia con quella sostanza perde qualsiasi efficacia. La metodica tradizionale impiega terreni all'uovo con farmaci incorporati; terreni di questo tipo esistono anche in commercio prodotti da varie Ditte ma, per la presenza di chemioantibiotici la cui attività diminuisce assai rapidamente, ne è consigliabile la preparazione in laboratorio. Nel metodo delle proporzioni originale [6] è previsto l'inoculo di ben tre serie complete di terreni (utilizzando per ciascuna una diversa diluizione della sospensione batterica) comprendenti, oltre ad una coppia di provettoni di controllo non antibiotati, più dosaggi

per ciascun farmaco. Risultati soddisfacenti si ottengono col metodo delle proporzioni semplificato [6] che riduce sensibilmente il numero dei terreni e quindi il costo del test.
Reagenti: Si utilizzano terreni all'uovo (Lowenstein-Jensen) con farmaci incorporati alle seguenti concentrazioni: acido para-aminosalicilico 0,5 μg / ml, isoniazide 0,2 μg / ml, streptomicina 4μg / ml, etambutolo 2 μg / ml, rifampicina 40 μg / ml; ai quali va aggiunto un Lowenstein-Jensen di controllo.
Procedimento: La preparazione delle sospensioni per l'inoculo, che varia a seconda che si impieghi il metodo diretto o quello indiretto, è già stata descritta in precedenza (v. pag. 43). Si inoculano, sia con la sospensione più concentrata che con quella più diluita, due serie complete di terreni (0,1 ml per tubo) e le si incubano a 37°C avendo cura che nei primi giorni le provette stiano in posizione inclinata e col tappo allentato.
Lettura: Si eseguono due letture: la prima, dopo 4 settimane, è da considerarsi valida solo per le resistenze, mentre la seconda, dopo 6 settimane, è quella definitiva. Al momento della lettura si valuta il numero delle colonie cresciute sui vari terreni e si calcola la percentuale, rispetto ai controlli, di quelle sviluppatesi in presenza dei singoli antibiotici. Avendo a disposizione due diverse serie di terreni, inoculati con sospensioni a diversa concentrazione, deve essere presa in considerazione per la lettura, di volta in volta, quella contenente il numero di colonie più significativo ignorando quella in cui tale numero è troppo elevato (confluente) o troppo basso. Ogni volta che la percentuale di resistenza è superiore ad 1% lo stipite deve essere considerato resistente al farmaco in questione.

Metodo delle proporzioni su piastra

L'uso dei terreni a base di agar per l'esecuzione della sensibilità dei micobatteri presenta, rispetto al sistema tradizionale, un duplice vantaggio: l'accorciamento dei tempi di lettura ed il miglioramento della qualità dei terreni. Il farmaco non è infatti sottoposto all'elevata temperatura necessaria per la coagulazione dei terreni all'uovo né è inattivato dal legame con le macromolecole presenti in questi ultimi.
Reagenti: Il terreno utilizzato può essere indifferentemente il 7H10 o il 7H11; per quanto riguarda poi gli antibiotici è assai pratico l'impiego di dischetti, reperibili in commercio (BD), impregnati con i principali farmaci antitubercolari, dai quali, una volta inglobati nel mezzo di coltura, la sostanza diffonde raggiungendo in breve una concentrazione uniforme. Il loro dosaggio è previsto per la diffusione in 5 ml di terreno, infatti la metodica originale [76] prevede l'impiego di piastre di Petri divise in 4 quadranti in ciascuno dei quali devono essere appunto versati, dopo avervi posto un dischetto impregnato, 5 ml di medium fuso (50°C circa).
Procedimento: Per l'inoculo si usano le due sospensioni batteriche già descritte in precedenza (v. pag. 43); a differenza di quanto visto a proposito del metodo su terreni all'uovo, solo una di queste (la più concentrata) è impiegata per seminare i vari quadranti della piastra contenenti i chemioantibiotici mentre con la più diluita si insemenzano due settori non antibiotati come controllo. Le piastre, racchiuse in un sacchetto di polietilene che ne impedisce la disidratazione ma che al contempo lascia passare la CO_2, vengono incubate a 37°C in atmosfera contenente anidride carbonica al5-10%.

Lettura: Essendo il terreno trasparente, le piastre possono essere osservate precocemente (dopo 7-10 gg.) al microscopio (100x) e l'eventuale presenza di resistenza a qualche farmaco può essere già refertata a questo punto. La lettura finale si esegue invece ad occhio nudo dopo 3 settimane, confrontando ciascun quadrante antibiotato con quello di controllo (fig. 13).

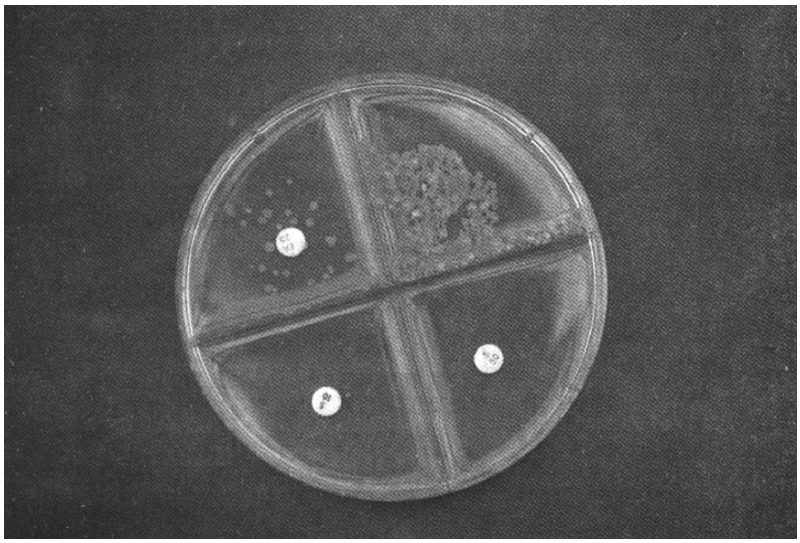


Figura 13. Sensibilità ai chemio-antibiotici, metodo delle proporzioni su piastra.

Essendo il controllo stato inoculato con una sospensione 100 volte più diluita, lo stipite in esame sarà sensibile a tutti i farmaci presenti in quei settori in cui il numero delle colonie sarà inferiore al controllo, in perfetto accordo col requisito della percentuale di resistenza inferiore al 1% che è alla base del metodo delle proporzioni.

Metodi "rapidi" in micobatteriologia

La radiometria

Esame colturale

Il metodo radiometrico si basa sul rilevamento di CO_2 radiomarcata liberata dall'attività metabolica di un microorganismo su un substrato contenente ^{14}C [42]. Per quanto riguarda il caso specifico dei micobatteri il terreno impiegato è il brodo 7H12 (in cui un atomo di C dell'acido palmitico è appunto sostituito dall'isotopo ^{14}C) addizionato con la miscela di antibiotici PACT (polimixina B, amfotericina B, carbenicillina e trimetoprim). Gli eventuali germi contaminanti presenti nel materiale in esame (eventualmente sfuggiti alla decontaminazione che deve comunque essere preventivamente

eseguita) risultano inibiti dall'azione degli antibiotici contenuti nel terreno che non sono invece attivi nei confronti dei micobatteri; questi ultimi metabolizzando, fra l'altro, l'acido palmitico liberano CO_2 radiomarcata. Un apposito β-counter preleva giornalmente, con un ago che attraversa il tappo di gomma del flaconcino, un campione di gas di cui misura la radioattività trasformandone il valore in indice di crescita (fig. 14).

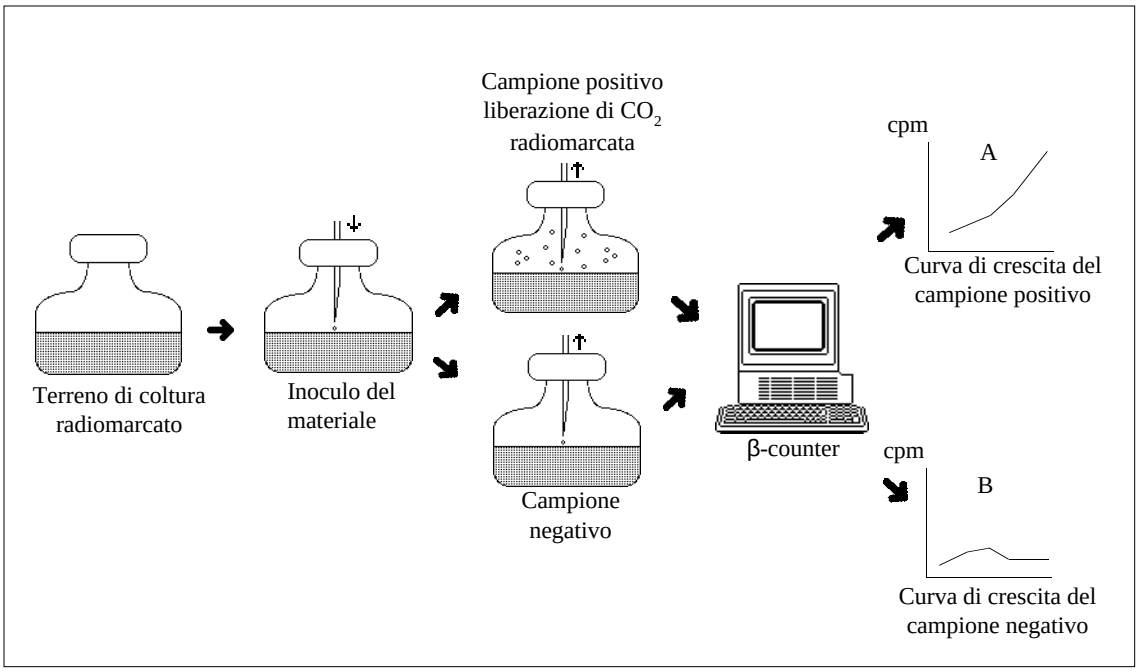


Figura 14. Il metodo radiometrico di ricerca dei micobatteri.

L'impiego del metodo radiometrico permette, rispetto a quelli convenzionali, di abbreviare del 30% circa i tempi di positivizzazione.

Identificazione

L'inoculo in parallelo di uno stipite micobatterico da identificare, in due flaconcini, uno normale ed uno addizionato con NAP (p-nitro-α-acetilamino-β-idrossipropiofenone) permette di distinguere i ceppi inibiti dal NAP (*M. tuberculosis* complex) da quelli noninibiti (MOTT) [32].

Antimicobatteriogramma

Per l'esecuzione dell'antimicobatteriogramma occorre inoculare il ceppo in esame in una serie di flaconcini di 7H12 contenenti i singoli antibiotici, oltre che in un flacone normale come controllo. L'inoculo del controllo viene eseguito con una sospensione 100 volte più diluita di quella impiegata per i terreni antibiotati. La lettura può essere eseguita non appena il flaconcino di controllo avrà raggiunto un indice di crescita di 50 unità: confrontando gli incrementi dei singoli indici di crescita si dovrà parlare di resistenza in tutti i casi in cui l'incremento relativo alla coltura in terreno antibiotato risulterà superiore a quello del controllo. Per effetto della diluizione del controllo utilizzata risultano quindi resistenti (in accordo a quanto visto nel metodo delle proporzioni) gli stipiti aventi, verso un determinato farmaco, una percentuale di microorganismi non sensibili >1% [56, 31].

DNA probes

Ricerca ed identificazione

La tecnologia delle sonde molecolari (probes) sta trovando nei micobatteri uno dei più promettenti campi di applicazione; il vantaggio della rapidità che tali metodiche offrono risulta infatti amplificato dal confronto con i tempi lunghi che caratterizzano la coltura e l'identificazione dei microorganismi suddetti. Il principio su cui tali tecnologie si basano è il seguente: tutti gli organismi viventi possiedono nel loro genoma, accanto a sequenze nucleotidiche aventi un certo grado di omologia con quelle di altre specie (omologia più o meno elevata a seconda della distanza filogenetica), altre sequenze del tutto specie-specifiche. Tali porzioni genomiche specifiche possono essere impiegate, una volta individuate, clonate, e rese disponibili in forma di singola elica, come probes. Mettendo in contatto il materiale genomico di una specie da identificare con una sonda di cui sia nota la specificità, se nella miscela di reazione esistono filamenti di acido nucleico complementari, (e ciò è vero solo nell'eventualità che il microorganismo sconosciuto appartenga alla stessa specie di quello da cui è stata preparata la sonda) questi tenderanno inesorabilmente ad unirsi formando una doppia elica. Il bersaglio dei probes può essere sia il DNA nucleare denaturato, sia il RNA ribosomiale; in questo ultimo caso si aumenta enormemente la sensibilità del metodo (vi sono circa 10.000 ribosomi per cellula) e si esclude la possibilità di riformazione di doppie eliche, a partire dal DNA denaturato, in competizione con la sonda. La disponibilità di sonde specifiche per i micobatteri clinicamente più significativi; la possibilità di separare, al termine della reazione, i filamenti di DNA a catena singola da quelli ibridizzati, cioè a doppia elica; e la valutazione quantitativa di questi ultimi sono i presupposti che hanno reso praticabile la tecnologia a livello di laboratorio diagnostico. Per il momento sono in commercio probes specifici per i micobatteri del *M. tuberculosis* complex e per le specie *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. gordonae*. La messa a punto del metodo per l'identificazione delle colture è già un fatto acquisito (specificità=100%) [12], mentre è imminente l'introduzio-

ne in commercio del kit utilizzabile per la ricerca del micobatterio tubercolare direttamente sull'escreato. La tecnica (fig. 15) prevede:

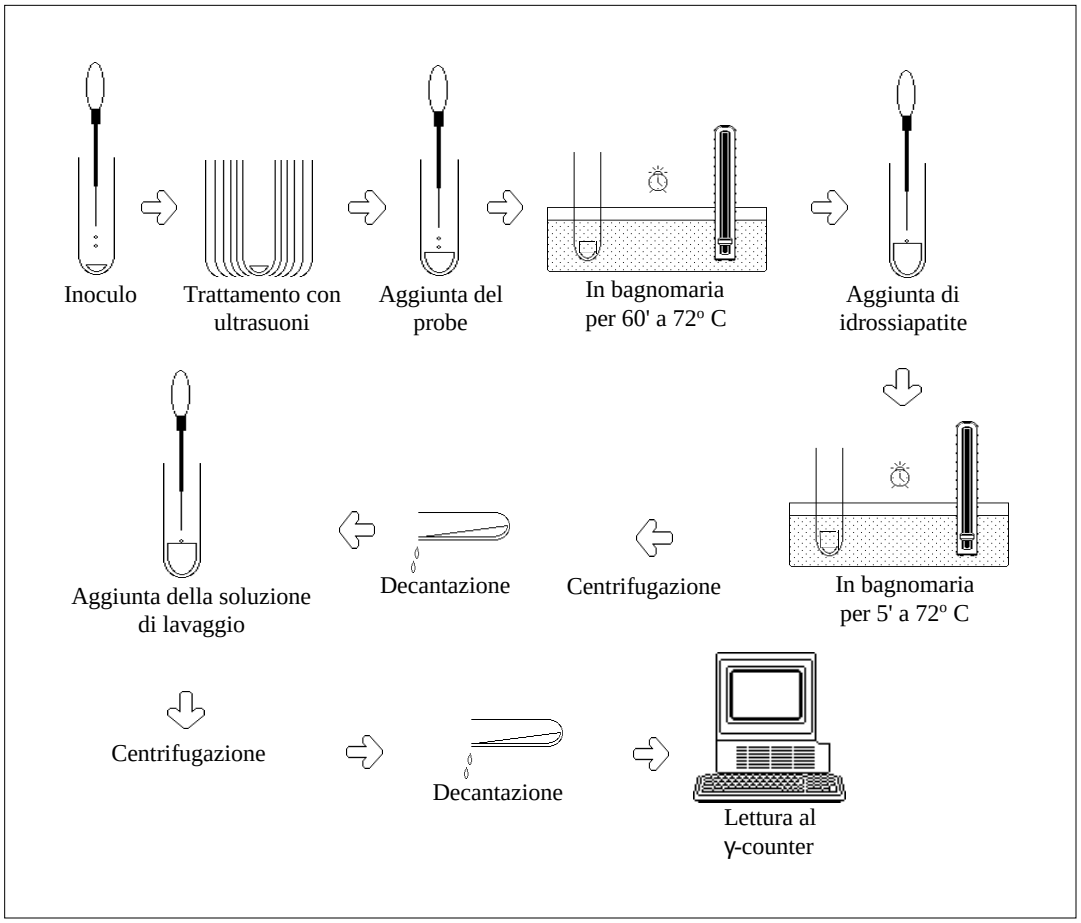


Figura 15. Identificazione dei micobatteri con i DNA-probes.

1) la lisi delle cellule batteriche mediante l'azione combinata di una soluzione apposita e del trattamento con ultrasuoni; 2) l'incubazione in ben determinate condizioni di stringenza (72°C); 3) la separazione mediante aggiunta di idrossiapatite (alla quale si adsorbono solo i filamenti ibridizzati) e successiva centrifugazione / decantazione; 4) un lavaggio e la lettura finale con un γ-counter (le sonde sono infatti marcate con ^{125}I ed il rapporto fra la conta totale del probe ed i CPM del campione fornisce la percentuale di ibridizzazione).

Antimicobatteriogramma

E‘ attualmente oggetto di indagine la possibilità di impiego delle sonde molecolari per la determinazione della sensibilità dei micobatteri ai farmaci. Si tratta di inoculare con lo stipite in esame una serie di terreni liquidi addizionati, o non (controlli), con i singoli antibiotici da testare, e di eseguire dopo alcuni giorni, su tali colture, il saggio dell'ibridizzazione usando la sonda specifica. Il microorganismo sarà sensibile solo ai farmaci presenti in quei terreni che avranno dato, nella prova di ibridizzazione, esito negativo [20].

Cromatografia

L'applicazione della cromatografia allo studio dei micobatteri è essenzialmente legata all'analisi dei lipidi che entrano nella composizione della parete batterica. Mettendo infatti in evidenza le diversità presenti nel corredo lipidico delle singole specie micobatteriche è possibile risalire alla loro identificazione. Le varie tecniche cromatografiche vengono quindi impiegate per separare ed identificare i singoli componenti lipidici presenti nella parete cellulare del ceppo batterico in esame. La successiva analisi del pattern lipidico permette poi di risalire alla specie di appartenenza.

Ricerca dei micobatteri

Le applicazioni della gas-cromatografia attualmente utilizzate per la ricerca dei micobatteri sono essenzialmente rivolte a mettere in evidenza nel materiale patologico la presenza dell'acido tubercolostearico. Si tratta di un acido grasso saturo, a 18 atomi di C, metilato in posizione 10, che è caratteristico del genere *Mycobacterium* con la sola eccezione della specie *M. gordonae*. Il reperimento dell'acido grasso nel materiale in esame è quindi indicativo della presenza di micobatteri [30]. I tracciati cromatografici che si ottengono non sono tuttavia facilmente interpretabili (i risultati che meno degli altri danno adito a dubbi sono attualmente quelli ottenuti sul liquido cefalo-rachidiano) e per l'identificazione dei picchi è indispensabile la spettrometria di massa.

Identificazione

Strato sottile. Con la cromatografia su strato sottile (thin layer o TLC), che può essere mono o bi-dimensionale, si separano le varie frazioni lipidiche e glicolipidiche sotto forma di macchie: all'identificazione del costituente delle singole macchie si risale rapportando la loro distanza dal punto di deposizione a quella del fronte di avanzamento dell'eluente [3]. La TLC e stata determinante per l'attribuzione di dignità di specie al *M. szulgai* [39].

Gas-cromatografia e HPLC. La grande maggioranza delle tecniche gas-cromatografiche prevede, dopo l'estrazione degli acidi micolici dalla parete dei micobatteri, il loro clivaggio (fig. 16).

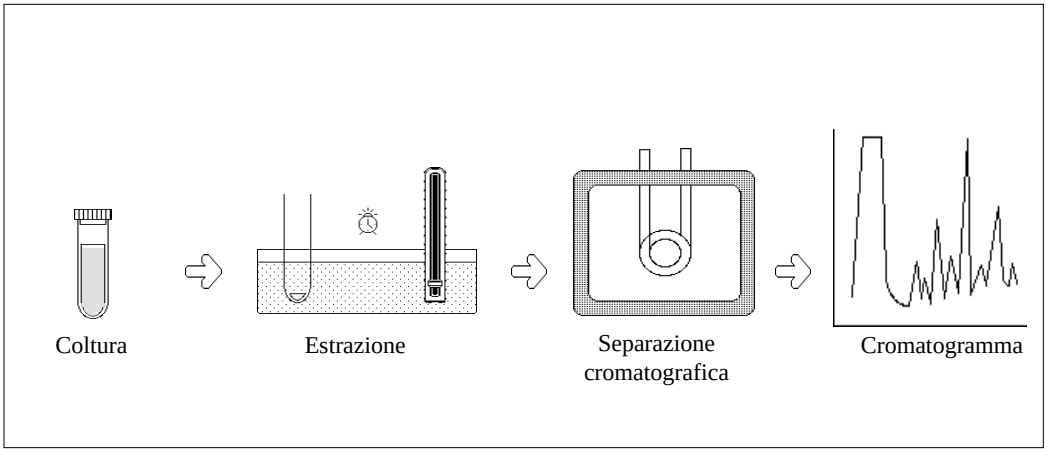


Figura 16. Gas cromatografia dei lipidi della parete cellulare.

Nella prima fase occorre distaccare, trasformandoli in esteri metilici, gli acidi grassi dai micosidi e dalle cere della parete mediante saponificazione basica [60] o, più vantaggiosamente, mediante metanolisi acida [17]. Il passaggio successivo consiste invece nella frammentazione di tali esteri mediante pirolisi e nell'iniezione nel cromatografo della miscela così ottenuta [15]. Il tracciato cromatografico che ne risulta è caratterizzato da una successione di picchi corrispondenti ai singoli prodotti di clivaggio. L'ordine di eluizione dei frammenti è dipendente dalle loro dimensioni: per primi quelli a minor numero di atomi di C e poi via via tutti gli altri; la loro identificazione si ottiene confrontando i tempi di ritenzione con quelli di standard appropriati o meglio, se disponibile, con la spettrometria di massa. I prodotti di clivaggio non sono, ovviamente, frammenti casuali bensì caratteristici dell'acido micolico da cui si sono originati e sono per lo più composti da 20-26 atomi di C. L'esame del cromatogramma permette di risalire dal pattern dei prodotti di clivaggio (valutati anche quantitativamente in base all'area del picco) alle specie di appartenenza. La continua ricerca di tecniche che permettano una miglior risoluzione dei picchi ha portato prima all'impiego di colonne cromatografiche capillari e successivamente alla sostituzione della gas-cromatografiacon la HPLC (in fase liquida).

Sierologia

ELISA

La sierologia della tubercolosi, per quanto visto a proposito della risposta immune, è stata a lungo trascurata e ritenuta priva di possibilità diagnostiche. Di una certa fortuna ha goduto fino a qualche anno fà la reazione di Middlebrook-Dubos, una emoagglutinazione condizionata considerata oggi del tutto priva di significatività clinica. Qualche prospettiva sembrano attualmente offrire i sistemi immunoenzimatici (ELISA) che impiegano l'antigene A60, un componente del PPD. Qualora i primi dati [2, 19] fossero confermati, la possibilità di mettere in evidenza, nei soggeti affetti da tubercolosi attiva, titoli anticorpali sensibilmente più elevati rispetto alla popolazione normale, vaccinata o non, costituirebbe un valido mezzo di diagnosi per le forme tubercolari non bacillifere.

Epidemiologia

Nonostante gli enormi successi dovuti all'introduzione della chemioterapia la tubercolosi rimane una malattia sociale. Si calcola che i malati siano, in tutto il mondo, circa 15 milioni mentre il numero dei morti annui raggiungerebbe i 3 milioni. Occorre inoltre rilevare che al notevolissimo calo di mortalità riscontrato nell'ultimo quarantennio non ha corrisposto una simile riduzione per quanto riguarda la comparsa di nuovi casi, rimasta pressochè stazionaria. Lo stretto legame fra resistenza alla tubercolosi e condizioni socioeconomiche di una popolazione è confermato dai dati statistici che rilevano un'incidenza della malattia inferiore allo 0,02% nei paesi sviluppati contro valori >1% nel terzo mondo. Anche la frequenza dell'infezione, rilevabile con i tests cutanei, è nettamente più elevata nelle popolazioni in via di sviluppo (>80%) rispetto alle nazioni occidentali dove sta ormai per scendere al disotto della soglia del 10%. Notevoli sono anche i cambiamenti che si stanno verificando, nelle popolazioni più sviluppate, per quanto riguarda le fasce di età più colpite: mentre fino a qualche tempo fà la tubercolosi era considerata una malattia dell'età giovanile, attualmente la fascia più colpita (in seguito a riattivazione di forme latenti) si sta spostando verso la terza età. Per quanto riguarda infine le micobatteriosi da MOTT la frequenza risulta inversamente proporzionale a quella della tubercolosi: bassissima nelle aree in cui quest'ultima è endemica, ed elevata, e soprattutto in continua ascesa, là dove il problema tubercolosi sembra ormai avviato a soluzione.

Bibliografia

1) Barsksdale L., Kim K.S.: *Mycobacterium*. Bacteriological Rewievs. (1977), 41, 217-372.
2) Benjamin R.G., Daniel T.M.: Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5[1-3]. Am. Rev. Respir. Dis. (1982), 126, 1013-1016.
3) Brennan P.J., Heifets M., Ullom B.P.: Thin-layer chromatography of lipid antigens as a means of identifying nontuberculous mycobacteria. J. Clin. Microbiol. (1982), 15, 447-455.
4) Buchanan R.E., Gibbons N.E.: Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. (1974), pgg. 1268. The Williams & Wilkins Comp.Baltimore.
5) 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 sensibility and resistance. Bull. WHO. (1963), 29, 565-578.
6) Canetti G., Rist N., Grosset J.: Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Rev. Tuberc. et Pneumol. (1963), 27, 217-272.
7) Carpi Torelli P., Tortoli E.: Impiego del dodecil-di(β-ossietil)benzilammonio-cloruro [Bactofen] come decontaminante nell'esame colturale per la ricerca del bacillo di Koch nell'escreato. Quad. Sclavo Diagn., (1980), 16, 196-205.
8) Casal M.: Mycobacteria of clinical interest. (1986), pgg. 366, Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
9) Casal M.R., Linares Sicilia M.J.: Preliminary investigation of *Mycobacterium tuberculosis* biovars. J. Clin. Microbiol. (1984), 20, 1015-1016.
10) Chapman J.: The atypical mycobacteria and human mycobacteriosis. (1977), pgg. 200, Plenum Ed.New York.
11) Corper H.J., Uyei N.: Oxalic acid as a reagent for isolating tubercle bacilli and a study of the growth of acid-fast nonpathogens on different mediums with their relactions to chemical reagents. J. Lab. Clin. Med. (1930), 15, 348-369.
12) Drake T.A., Hindler J.A., Berlin G.W., Bruckner D.A.: Rapid identification of Mycobacterium avium complex in culture using DNA probes. J. Clin. Microbiol. (1987), 25, 1442-1445.
13) Grange J.M.: Mycobacterial disease. (1980), pgg. 126, Edward Arnold London.
14) Green J.B., Sidhu G.S., Leasin S., Levine S.F., Masur H., Simberkoff M.S., Nicholas P., Good R.C., Zolla-Pazner S.B., Pollock A.A., Tapper M.C., Holzman R.S.: *Mycobacterium avium-intracellulare*: a cause of disseminated life threatening infection in homosexuals and drug abusers. Ann. Intern. Med. (1982), 97, 539-546.

15) Guerrant G.O., Lambert M.A., Moss C.W.: Gas-chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products in mycobacteria. J. Clin. Microbiol. (1981), 13, 899-907.
16) Hawkins J.E.: Scotochromogenic mycobacteria which appear intermediate between *Mycobacterium avium-intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. Am. Rev. Respir. Dis. (1977), 116, 963-964.
17) Jimenez J., Larsson L.: Heating cells in acid methanol for 30 min. without freeze-drying provides adequate yields of fatty acids and alcohols for gas-chromatographic characterization of mycobacteria. J. Clin. Microbiol. (1986), 24, 844-845.
18) Jones W.D.Jr., Good R.C., Thompson N.J., Kelly G.D.: Bacteriophage types of *Mycobacterium tuberculosis* in the United States. Am. Rev. Respir. Dis. (1982), 125, 640-643.
19) Kalish S.B., Radin R.C., Phair J.P., Levitz D., Zeiss C.R., Metzger E.: Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. J. Infect. Dis. (1983), 147, 523-530.
20) Kawa D.E., Pennel D.R., Kubista L.N.: Development of a rapid method for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using the GenProbe DNA hybridization system. (1989), ASM 1989 Abstracts, 158 U-22 .
21) 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 seraglutination characteristics. J. Clin. Microbiol. (1985), 21, 168-173.
22) Kilburn J.O., O'Donnell K.F., Silcox V.A., David H.L.: Preparation of a stable mycobacterial Tween hydrolysis test substrate. Appl. Microbiol. (1973), 26, 826.
23) Kinyoun J.J.: A note on Uhlenhulth's method for sputum examination for tubercle bacilli. Am. J. Public Health. (1915), 5, 867-870.
24) Kleeberg H.H., Koornhof H.J., Palmhert H.: Laboratory manual of tuberculosis methods. (1980), pgg. 211, Tb Resp. Inst. Pretoria.
25) Koch R.: Further communication on a remedy for tuberculosis. Dtsch. Med. Wochenschr. (1891), 17, 101.
26) Krasnow I., Kidd G.C.: The effect of a buffer wash of sputum sediments digested with Zephiran trisodium phosphate on the recovery of acidfast bacilli. Am. J. Clin. Pathol. (1965), 44, 238-240.
27) Kubica G.P.: Differential identification of mycobacteria . VII: Key features for identification of clinically significant mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. (1973), 107, 9-21.
28) Kubica G.P., Dye W.E., Cohn M.L., Middlebrook G.: Sputum digestion and decontamination with N-acetil-L-Cysteine sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. (1963), 87, 775-779.
29) Kubica G.P., Wayne L.G.: The mycobacteria: a sourcebook. (1984), pgg. 1557, Marcel Decker Inc. New York.
30) Larsson L., Mårdh P.A.: Detection of tuberculostearic acid in biological specimens by means of glass capillary gas chromatography: electron and chemical ionization mass spectrometry, utilizing selected ion monitoring. J. Chromatogr. (1980), 182, 402-408.

31) Laszlo A., Gill P., Handzel V., Hodgkin M.M., Helbecque D.M.: Conventional and radiometric drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis complex*. J. Clin. Microbiol. (1983), 18, 1335-1339.
32) Laszlo A., Siddiqi S.H.: Evaluation of a rapid radiometric differentiation test for the *Mycobacterium tuberculosis complex* by selective inhibition with p-nitro-α-acetylamino-β-hydroxypropiophenone. J. Clin. Microbiol. (1984), 19, 694-698.
33) Lévy-Frébault V., Grandry J., David H.L.: Evaluation of rapid tests for the identification of mycobacteria. J. Med. Microbiol. (1982), 15, 575-577.
34) MacFaddin : Media for isolation-cultivation-identification-manteinance of medical bacteria. (1985), The Williams & Wilkins Comp. Baltimore.
35) Mandler F.: Micobatteri patogeni non tubercolari. (1977), pgg. 38, Essex.
36) Mandler F., Penati V., Lacchini C.: Un nuovo test per il rilievo della niacina nei Micobatteri. Boll. Microb. e Indag. Lab. (1985), 3, 51-52.
37) Mandler F., Peona V.: Micobatteriosi e micobatteri non tubercolari. (1987), pgg. 126, Masson Italia Ed. Milano.
38) Marks J.: Classification of mycobacteria in relation to clinical significance. Tubercle. (1972), 53, 210-217.
39) Marks J., Szulga T.: Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification: technical procedures. *Mycobacterium fortuitum*. Tubercle. (1965), 46, 400-411.
40) Meyer L., David H.L.: Mycobactériologie en Santé publique. Publication du Centre National de référence puor la tuberculose et les mycobactéries. (1979), Institut Pasteur Paris.
41) Meyer L., David H.L.: Evaluation de l'activité uréase et de l'activité β-glucosidase pour l'identification pratique des mycobactéries. Ann. Microbiol. (1979), 130B, 323-332.
42) Middlebrook G., Reggiardo Z., Tigert W.D.: Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. Am. Rev. Respir. Dis. (1977), 115, 1066-1069.
43) Minnikin D.F., Goodfellow M.: Lipid composition in the classification and identification of acid-fast bacteria. (1980), 189-256. In: Goodfellow M., Board R.G. (Eds.): Microbiological classification and identification. Academic Press Ltd. London.
44) Morse W.C., Blair E.B., Weiser O.L., Rothlauf M.V.: Mycobacteriology laboratory methods. Report 283. (1964), U.S. Army Medical Research and Nutrition Laboratoratory. Fitsimons G.H. Denver.
45) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. M2-A3. (1984).
46) Neelsen : Fortschr. Med. (1885), 3, 198.
47) Noll H.: The chemistry of cord factor, a toxic glycolipid of *Mycobacterium tuberculosis*. Adv. Tuberc. Res. (1956), 7, 149.
48) Penati V., Lacchini C., Bosisio G., Mandler F.: Sensibilità al Ciprofloxacin come criterio differenziale tra *Micobacterium fortuitum* e *M. chelonei*. Microbiologia medica. (1986), 4, 161.
49) Petroff S.A.: Some cultural studies on the tubercle bacillus. Bull. J. Hopkins Hosp. (1915), 26, 132-141.

50) Richards O.W., Miller D.K.: An efficient method for the identification of tuberculosis bacteria with a simple fluorescence microscope. Am. J. Clin. Pathol. Tech. (1941), suppl. 5, 1-8.
51) Runyon E.H.: Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. North Am. (1959), 43, 273-290.
52) Runyon E.H., Wayne L.G., Kubica G.P.: Family II: Mycobacteriaceae Chester 1897. (1974), 681-701. In: Buchanan R.E., Gibbons N.E. (Eds.): Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The Williams & Wilkins Comp. Baltimore.
53) Schaefer W.B.: Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. Am. Rev. Respir. Dis. (1965), 92, 85-93.
54) Schaefer W.B.: Serological identification of atypical mycobacteria. Methods Microbiol. (1979), 13, 323-344.
55) Schröeder K.H., Juhlin I.: *Mycobacterium malmoense* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. (1977), 27, 241-246.
56) Siddiqi S.H., Libonati J.P., Middlebrook G.: Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis.* J. Clin. Microbiol. (1981), 13, 908-912.
57) 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*. J. Clin. Microbiol. (1975), 1, 411-413.
58) Sommers H.M., Good R.C.: Mycobacterium. (1985), 216-248. In: Lennette E.H., Ballows A., Hausler W.J.Jr., Shadomy M.J. (Eds.): Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology Washington.
59) Sompolinsky D., Lagziel A., Naveh D., Yankilevitz T.: *Mycobacterium haemophilum* sp. nov., a new patogen of humans. Int. J. Syst. Bacteriol. (1978), 28, 67-75.
60) Tisdall P.A., DeYoung D.R., Roberts G.D., Anholt J.P.: Identification of clinical isolates of mycobacteria with gas-liquid chromatography: a 10-mounth follow-up study. J. Clin. Microbiol. (1982), 16, 400-402.
61) Tortoli E.: Micobatteri. (1981), 380-408. In: Pasquinelli F.: Diagnostica e tecniche di laboratorio. Rosini Ed. Firenze.
62) Tortoli E.: Prime valutazioni sull'impiego del cloruro di dodecildi(β-ossietil)-benzilammonio quale decontaminante di routine per l'isolamento dei micobatteri. Quad. Sclavo Diagn. (1981), 17, 277-282.
63) Tortoli E.: Computer aided identification of mycobacteria: a prototype of software to interpret the results of cultural and biochemical tests. (in stampa). (1990).
64) Tortoli E., Carpi Torelli P.: Influenza del sistema di decontaminazione sull'isolamento dei micobatteri non tubercolari dall'escreato. (1983), 217-221. In: Covelli I., Mandler F., Vaiani R. (Ed.): Patogeni emergenti. AMCLI Reggio Emilia.
65) Tortoli E., Simonetti M.T.: Esame colturale dell'escreato per la ricerca dei micobatteri: confronto di due metodiche. Boll. Microb. e Indag. Lab. (1988), 8, 21-25.
66) Tsukamura M.: Diagnosis of non-tuberculous mycobacteriosis. (1986), 251-262. In:Casal M. (Ed.): Mycobacteria of clinical interest. Elsevier Science Publishers Amsterdam.

67) Tsukamura M.: Chemotherapy of lung tuberculosis by a new antibacterial substance ofloxacin. (DL 8280). (1986), 234-240. In: Casal M. (Ed.): Mycobacteria of clinical interest. Elsevier Science Publishers Amsterdam.
68) United States Veteran Administration, Department of Medicine and Surgery. Tuberculosis laboratory methods for the V. A. Armed Forces. Cooperative study on the chemotherapy of tuberculosis. (1960). Washington.
69) Vestal A.L.: Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. (1975), U.S. Public Health Service Publ. 75-8230. Center of Disease Control Atlanta.
70) Virtanen S.: A study of nitrate reduction by mycobacteria. Acta Tuberc. Scand. (1960), suppl. 48, 1-191.
71) Wallace R.J.Jr., Dalovisio J.R., Pankey G.A.: Disk diffusion testing of susceptibility of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonei* to antimicrobical agents. Antimicrob. Agents Chemother. (1979), 16, 611-614.
72) Warren N.G., Body B.A., Dalton H.P.: An improved reagent for mycobacterial nitrate reductase test. J. Clin. Microbiol. (1983), 18, 546-549.
73) Wayne L.G.: Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. Am. Rev. Respir. Dis. (1962), 86, 651-656.
74) Wayne L.G., Engbaek H.C., Engel H.W.B., Froman S., Gross W., Hawkins J., Käppler W., Karlson A.G., Kleeberg H.H., Krasnow I., Kubica G.P., McDurmont C., Nell E.E., Pattyn S.R., Schröder K.H., Showalter S., Tarnok I. Tsukamura M., Vergmann B., Wolinsky E.: Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for pigment, urease, resistance to sodium chloride, hydrolysis of Tween 80, and beta-galactosidase. Int. J. Syst. Bacteriol. (1974), 24, 412-419.
75) Wayne L.G., Engel H.W.B., Grassi C., Gross W., Hawkins J., Jenkins P.A., Käppler W., Kleeberg H.H., Krasnow I., Nel E.E., Pattyn S.R., Richards P.A., Showalter S., Slosarek M., Szabo I., Tarnok I., Tsukamura M., Vergmann B., Wolinsky E.: Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: test for niacin and catalase and for resistance to isoniazid, thiophene 2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine, and p-nitrobenzoate. Int. J. Sist. Bacteriol. (1976), 26, 311-318.
76) Wayne L.G., Krasnow I.: Preparation of tuberculosis susceptibility testing medium by means of impregnated discs. Am. J. Clin. Pathol. (1966), 45, 769-771.
77) Wayne L.G., Krichevsky M.I., Portyrata D., Jackson C.K.: Diagnostic probability matrix for identification of slowly growing mycobacteria in clinical laboratories. J. Clin. Microb. (1984), 20, 722-729.
78) Withe R.G., Bernstock L., Johns R.G.S., Lederer E.: The influence of components of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria upon antibody production to ovalbumin. Immunology. (1958), 1, 54-66.
79) Wolinsky E.: Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am. Rev. Respir. Dis. (1979), 119, 107-159.
80) Young W.D.Jr., Maslansky A., Lefar M.S., Kronish D.P.: Development of a paper strip test for detection of niacin produced by mycobacteria. Appl. Microbiol. (1970), 20, 939-945.

Indice

Istruzioni per gli Autori....pag. 2
Editoriale.... » 3
Generalità.... » 5
Le *Actinomycetales*.... » 5
Morfologia.... » 5
Caratteristiche biologiche .... » 5
Struttura cellulare .... » 6
I lipidi della parete cellulare.... » 6
Struttura antigenica .... » 7
Sensibilità ai chemioantibiotici .... » 7
Le specie isolabili da materiali biologici di provenienza umana.... » 8
Criteri classificativi.... » 8
La classificazione di Runyon .... » 8
Il *M. tuberculosis* complex.... » 9
M. ulcerans .... » 10
M. leprae .... » 11
I micobatteri fotocromogeni .... » 11
I micobatteri scotocromogeni .... » 12
I micobatteri non cromogeni.... » 13
I micobatteri a crescita rapida .... » 14
Patogenicità .... » 15
Le infezioni da micobatteri.... » 15
La tubercolosi.... » 15
Le micobatteriosi .... » 16
AIDS ed infezioni da micobatteri.... » 16
La lebbra .... » 16
Immunologia .... » 17
Immunità cellulare ed umorale.... » 17
Il fenomeno di Koch .... » 17
I tests cutanei .... » 18
La vaccinazione .... » 18
Diagnostica di laboratorio .... » 19
La sicurezza nel laboratorio di micobatteriologia.... » 19
I campioni biologici .... » 20
Esame microscopico .... » 20
Alcool-acido resistenza.... » 20
Lo striscio.... » 21
Colorazione di Ziehl-Neelsen.... » 21
Microscopia in fluorescenza .... » 22
Colorazione di Kinyoun .... » 23
Refertazione .... » 23

Esame colturale ..... » 24
I terreni di coltura..... » 24
Trattamenti preliminari..... » 25
La fluidificazione ..... » 25
La decontaminazione ..... » 26
Trattamento di materiali particolari ..... » 28
La coltura..... » 29
L'incubazione ..... » 29
Lettura e refertazione ..... » 30
La prova biologica..... » 30
L'identificazione ..... » 31
Speciazione..... » 31
Produzione di niacina ..... » 31
Riduzione dei nitrati..... » 32
Termoinattivazione della catalasi..... » 33
Le prove per la tipizzazione dei MOTT ..... » 33
Chiave di identificazione..... » 37
La tassonomia numerica..... » 40
Tipizzazione ..... » 40
Antimicobatteriogramma ..... » 41
I farmaci antitubercolari ..... » 41
I farmaci anti-MOTT ..... » 41
Resistenza primaria e secondaria..... » 42
Il saggio della sensibilità ..... » 42
Sistema diretto ed indiretto..... » 42
Generalità..... » 43
Metodo delle proporzioni..... » 43
Metodo delle proporzioni su piastra ..... » 44
Metodi "rapidi" in micobatteriologia ..... » 45
La radiometria..... » 45
Esame colturale ..... » 45
Identificazione..... » 46
Antimicobatteriogramma ..... » 47
DNA probes ..... » 47
Ricerca ed identificazione..... » 47
Antimicobatteriogramma ..... » 49
Cromatografia..... » 49
Ricerca dei micobatteri..... » 49
Identificazione..... » 49
Sierologia..... » 51
ELISA ..... » 51
Epidemiologia ..... » 52
Bibliografia..... » 53
Indice ..... » 58
Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio..... » 60

Volumi pubblicati nella collana Caleidoscopio

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La ß-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*****Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**

34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno ’88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d’abuso (2).*** **Luglio ’88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre ’88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio ’89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M..: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. : ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
51. Tortoli E. e Simonetti M.T.: ***I micobatteri*****. Maggio '90.**

Caleidoscopio
anno 8, numero 51

Rivista monografica di Medicina

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
(079) 270464

Editore
Medical Systems S.P.A.
Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
tel. (010) 808051(7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 804661- 802257.

Segretaria di Direzione
Fiorella Gaggero

Servizio Abbonamenti
Franca Giordano

Stampa
ATA - Azienda Tipografi Associati srl
Via G. Torti, 32 C. Rosso - Tel. (010)513120 - Telefax (010) 503320
16143 Genova

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

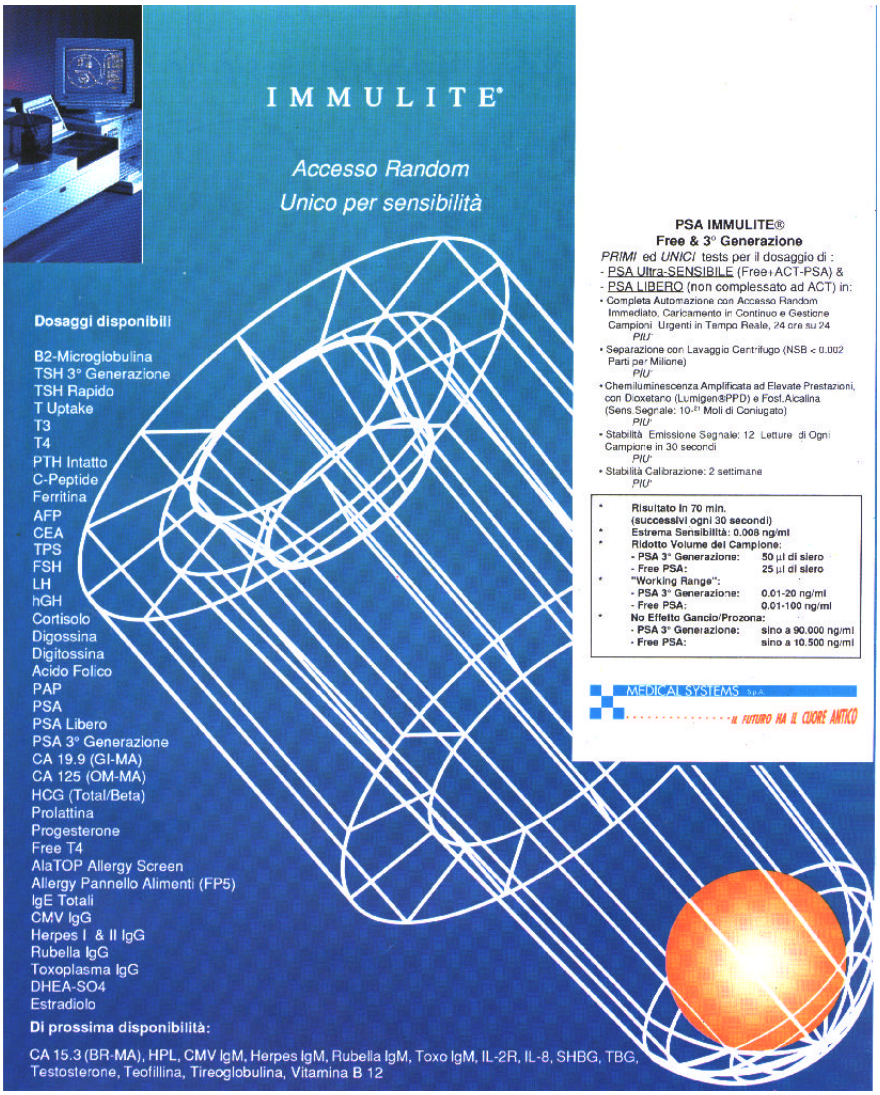
Finito di stampare nel Maggio 1990

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)


IMMULITE®
Accesso Random
Unico per sensibilità
Dosaggi disponibili
B2-Microglobulina
TSH 3° Generazione
TSH Rapido
T Uptake
T3
T4
PTH Intatto
C-Peptide
Ferritina
AFP
CEA
TPS
FSH
LH
hGH
Cortisolo
Digossina
Digitossina
Acido Folico
PAP
PSA
PSA Libero
PSA 3° Generazione
CA 19.9 (GI-MA)
CA 125 (OM-MA)
HCG (Total/Beta)
Prolattina
Progesterone
Free T4
AlaTOP Allergy Screen
Allergy Pannello Alimenti (FP5)
IgE Totali
CMV IgG
Herpes I & II IgG
Rubella IgG
Toxoplasma IgG
DHEA-SO4
Estradiolo
Di prossima disponibilità:
CA 15.3 (BR-MA), HPL, CMV IgM, Herpes IgM, Rubella IgM, Toxo IgM, IL-2R, IL-8, SHBG, TBG, Testosterone, Teofillina, Tireoglobulina, Vitamina B 12
PSA IMMULITE®
Free & 3° Generazione
PRIMI ed UNICI tests per il dosaggio di :
- PSA Ultra-SENSIBILE (Free+ACT-PSA) &
- PSA LIBERO (non complessato ad ACT) in:
• Completa Automazione con Accesso Random Immediato, Caricamento in Continuo e Gestione Campioni Urgenti in Tempo Reale, 24 ore su 24
PIU'
• Separazione con Lavaggio Centrifugo (NSB < 0.002 Parti per Milione)
PIU'
• Chemiluminescenza Amplificata ad Elevate Prestazioni, con Dioxetano (Lumigen®PPD) e Fost.Alcalina (Sens.Segnale: 10-21 Moli di Coniugato)
PIU'
• Stabilità Emissione Segnale: 12 Letture di Ogni Campione in 30 secondi
PIU'
• Stabilità Calibrazione: 2 settimane
PIU'
* Risultato in 70 min. (successivi ogni 30 secondi)
* Estrema Sensibilità: 0.008 ng/ml
* Ridotto Volume del Campione:
- PSA 3° Generazione: 50 µl di siero
- Free PSA: 25 µl di siero
* "Working Range":
- PSA 3° Generazione: 0.01-20 ng/ml
- Free PSA: 0.01-100 ng/ml
* No Effetto Gancio/Prozona:
- PSA 3° Generazione: sino a 90.000 ng/ml
- Free PSA: sino a 10.500 ng/ml
MEDICAL SYSTEMS S.p.A.
IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO