www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio



Giuseppe Miragliotta,

Giuseppina Barra Parisi, Antonio De Santis, Emanuele Vinci

La Tubercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio

Direttore Responsabile Sergio Rassu

... il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

Caleidoscopio



Giuseppe Miragliotta,

Giuseppina Barra Parisi, Antonio De Santis*, Emanuele Vinci

Cattedra di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Bari *Laboratorio Analisi, Ospedale San Paolo, Bari, **Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Fasano Brindisi

La Tubercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio

Direttore Responsabile **Sergio Rassu**

169

... il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

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 e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie 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, fax ed indirizzo di E-mail) 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 (in bianco e nero eccetto 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 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, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e 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 in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con 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. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

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

R.A.H.P. sas Via Pietro Nenni, 6 07100 Sassari

Caleidoscopio

Editoriale

La presentazione di questa monografia mi offre l'opportunità di innescare un sano dibattito sulla relazione che esiste tra informazione scientifica e epidemiologia, tra aspetti sociali e psicologici delle malattie. Sarebbe infatti molto interessante individuare le motivazioni che stanno alla base della diversa rilevanza data in questi ultimi mesi a patologie con un impatto così diverso. Infatti, secondo dati epidemiologici pubblicati non più di un mese fa, è stato stimato che ogni anno nel mondo vengono registrati oltre otto milioni di nuovi casi di tubercolosi ed una mortalità di circa 1,8 milioni di malati in un anno. La SARS una malattia infettiva "emergente" nell'arco di otto mesi (dal 1 novembre al primo luglio) ha fatto registrare un numero totale di casi sospetti e probabili di 8.445 con 812 morti. Il dibattito è aperto e forse potrebbe costituire lo spunto per una monografia su questo tema di estrema importanza.

Veniamo agli Autori della monografia che presento con il consueto piacere poichè questo lavoro costituisce il frutto di una lunga ed accurata preparazione il cui primo germe è stato seminato tre anni fa.

Il Prof. Giuseppe Miragliotta dopo la laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Bari ha conseguito il diploma di specializzazione in Ematologia, quindi in Ricerca Farmacologica e infine in Microbiologia. E' stato "Visiting Scientist" presso il Forshungsinstitut fur Experimentelle Biologie und Medicine di Borstel, Germania e, successivamente, Ricercatore, Professore Associato di Microbiologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Bari. Attualmente è Professore Ordinario della stessa disciplina. Il Prof. Miragliotta è responsabile di progetti internazionali del CNR e del MURST. I principali interessi di ricerca riguardano gli effetti biologici delle endotossine batteriche, i meccanismi patogenetici delle complicanze tromboemorragiche delle sepsi da batteri Gram-negativi, l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare nella diagnostica delle malattie infettive, soprattutto tubercolosi e micobatteriosi. Il Prof. Miragliotta è membro dell'American Society of Microbiology, dell'ESCMID, ed è Consigliere

Nazionale dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCII). Autore di 145 lavori pubblicati su riviste internazionali, un manuale di microbiologia, quattro monografie e coautore di un importante manuale di Microbiologia Medica edita da McGraw-Hill Italia.

Il dottor Antonio De Santis ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Bari; nella stessa sede si è specializzato in Patologia Generale ed in Igiene e Medicina Preventiva. In più riprese ha svolto stage professionali in Inghilterra presso Laboratori di Microbiologia. Ha partecipato, in qualità di relatore, su vari temi di patologia clinica e di microbiologia, a congressi locali e nazionali. Attualmente dirige il Laboratorio di Analisi Chimiche e Microbiologiche dell'Ospedale San Paolo di Bari. È interessato particolarmente, nell'ambito della propria attività professionale, alla diagnostica micobatteriologica che svolge in stretta collaborazione con la Cattedra di Microbiologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Bari.

Il dottor Emanuele Vinci ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Bari; nella stessa sede si è specializzato in Ematologia Clinica e di Laboratorio ed in Microbiologia. E' stato nominato docente a contratto presso la Scuola di specializzazione in Microbiologia dell'Università degli Studi di Bari. Successivamente ha collaborato al progetto "Attuazione del Sistema Qualità nel Dipartimento di Medicina di Laboratorio" su incarico dell'Istituto Scientifico Biomedico Euro Mediterraneo ed in collaborazione con l'Istituto di Fisiologia Clinica del CNR. Autore di diversi lavori scientifici pubblicati su riviste locali e nazionali, ha partecipato in qualità di relatore su vari temi di patologia clinica e di microbiologia ad eventi di aggiornamento regionali. Attualmente è Direttore dell'U.O. Patologia clinica del P. O. Ostuni-Fasano-Cisternino.

La dott.ssa Giuseppina Barra Parisi ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia presso l'Università degli Studi di Bari; nella stessa sede si è specializzata in Microbiologia. È dottoranda di ricerca in "Scienze Infettivologiche" presso l'Università degli Studi di Bari. Coautrice di numerosi lavori, soprattutto in ambito micobatteriologico, presentati in Congressi nazionali ed internazionali. Svolge attività didattica nella Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia dell'Università degli Studi di Bari.

Sergio Rassu



Premessa

La richiesta da parte di Studenti e Specializzandi nelle varie Discipline medico-chirurgiche in cui la Microbiologia Clinica gioca il suo importante ruolo per la diagnosi e la terapia delle infezioni mi ha spinto ad approntare questo breve manuale sulla diagnostica di laboratorio della tubercolosi polmonare.

È noto come il problema tubercolosi sia ampiamente "riemerso", come è chiaro che soltanto dallo sforzo di tutti gli operatori dei vari settori interessati potrà venire la risoluzione del problema. Proprio in quest'ottica allargata non è sembrato inopportuno fornire, nel testo, una serie di collegamenti tra diagnostica di laboratorio in senso stretto ed aspetti storici, clinici e terapeutici di questa malattia così complessa che promette di riservare all'umanità ancora molte sorprese.

Mi è gradito infine ringraziare il professore Enzo Gramiccioni ed il dottor Claudio Piersimoni per la rilettura attenta delle parti del testo di loro competenza, nonché il signor Giovanni Mazzeo per l'aiuto nella preparazione del manoscritto e dell'iconografia.

Giuseppe Miragliotta Professore Ordinario di Microbiologia Facoltà di Medicina e Chirurgia Università degli Studi di Bari

1. Introduzione

La tubercolosi rappresenta nel mondo la causa più frequente di morte per singola malattia infettiva. Si calcolano annualmente oltre 3 milioni di decessi ed oltre 8 milioni di nuovi casi, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. Più di un terzo della popolazione mondiale risulta infettato da *Mycobacterium tuberculosis* (1, 2).

La tubercolosi, nei secoli precedenti il 1600, è sempre stata una malattia sporadica che non ha mai prodotto grandi epidemie sia in Europa che nei paesi d'oltreoceano. L'affermazione della tubercolosi come importante malattia sociale è cominciata in Inghilterra in seguito alla rivoluzione industriale con lo spostamento di grandi masse dalla campagna nelle grandi città e nei grandi complessi urbani. Il sovraffollamento, la povertà e la denutrizione conseguenti furono quindi elementi fondamentali per lo sviluppo della malattia e del contagio interumano.

La tubercolosi oggi è considerata dalla Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) una emergenza mondiale con un numero di infettati, malati e morti in costante ascesa, essendo peraltro complicata da alcune condizioni aggravanti quali l'aumento dei soggetti HIV positivi, da una scarsa o assente attività di quelle strutture sanitarie che un tempo la gestivano ed infine resa più insidiosa dalla sottovalutazione e dalla scarsa conoscenza della malattia stessa (3).

Già da tempo il problema è stato inquadrato. Infatti, i Centers for Disease Control and Prevention di Atlanta, USA, nonostante il trend in discesa di nuovi casi di tubercolosi negli Stati Uniti osservati dal 1980 al 1984, stimarono, per il periodo dal 1985 al 1992, un aumento della malattia di ben 51.000 casi. Il numero annuale dei morti attesi dal 1990 al 1999 ammontava a 3 milioni; si ipotizzò che dal 2000 sarebbero stati annualmente 3,5 milioni (4) (Figura 1). La tubercolosi è presente, oltre che nei paesi in via di sviluppo, anche nei paesi industrializzati, favorito soprattutto dal forte flusso migratorio verso i paesi industrializzati, con la presenza in questi di minoranze etniche costrette a vivere in condizioni ambientali disumane (Figura 2).

A fronte di questa nuova realtà epidemiologica le risorse finanziarie da investire nei programmi sanitari di prevenzione risultano essere inadeguate, non soltanto nei paesi in via di sviluppo ma anche in quelli industrializzati.

In Italia, in particolare nel secolo scorso, la tubercolosi è stato un fenomeno diffuso e percepito con grande ansia, tanto che all'inizio del '900 fu creata una rete capillare di lotta alla malattia tubercolare su tutto il territorio nazionale che ha prodotto nel tempo un controllo efficace della malattia. Questa è passata infatti da una incidenza iniziale di circa 200 casi per 100.000 abitanti a tassi di incidenza molto bassi e inferiori a 10 per 100.000 abitanti (5).

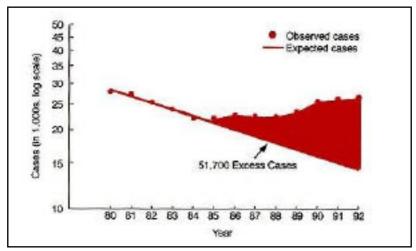


Figura 1. CDC, MMWR, 42: 696-704, 1993.

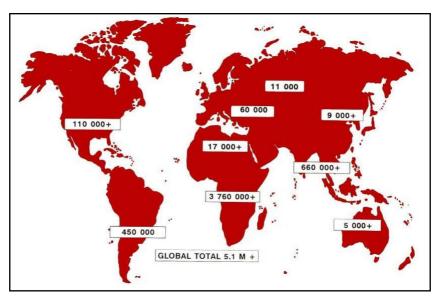


Figura 2. Numero di adulti che sono stati infettati da HIV e tubercolosi nell'anno 1993. (Snider D.E. et al., 1994).

Purtroppo, nonostante il valore di questi dati, la legge di riforma sanitaria del 1978 ha praticamente annullata la rete di controllo antitubercolare italiana costituita dai consorzi antitubercolari e da tutte le strutture connesse (Figura 3). Tutte le informazioni sulla epidemiologia e sul controllo della

malattia si sono quindi perse in una serie di attività amministrative contenute all'interno di un controllo generico delle malattie infettive (6).



Figura 3. Sanatorio presso la città di Sondalo (Villaggio Morelli).

Al momento in Italia non esistono dati molto precisi sulla prevalenza, incidenza e mortalità della tubercolosi sia per i problemi esposti sia, soprattutto, per la non corretta esecuzione delle procedure di notifica dei casi sospetti o accertati. Nel 1999 sono stati pubblicati i risultati di uno studio condotto dall'Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO) relativo all'incidenza dei casi di tubercolosi accertati nel 1997. In particolare è stato riportato un totale di 715 casi di cui 635 nuovi. Tale dato non si discosta dai casi di tubercolosi accertati nei precedenti anni 1995 e 1996 (7).

Un ruolo importante nella prevenzione è senz'altro quello giocato dalla rapidità della diagnosi di infezione tubercolare. Tale diagnosi è complicata dalle caratteristiche biologiche dei micobatteri e dalla peculiarità dell'interazione ospite-parassita. In questo nostro contributo abbiamo rivolto la massima attenzione all'aspetto diagnostico di laboratorio della malattia, pur non tralasciando dei cenni orientativi sull'aspetto clinico-terapeutico.

2. Tassonomia dei micobatteri

Il genere Mycobacterium appartiene alla famiglia delle Mycobacteriaceae, ordine Actinomycetales (nello stesso ordine sono presenti anche le famiglie Actinomicetaceae e Nocardiaceae). Nel genere Mycobacterium sono presenti con Mycobacterium tuberculosis almeno altre 74 specie, delle quali 28 sono associate a patologia nell'uomo (1).

Mycobacterium tuberculosis ha monopolizzato l'interesse dei medici per più di 70 anni, dal 1882, data della sua scoperta da parte di Robert Koch (Figura 4), fino al 1959, anno nel quale E. H. Runyon richiamava l'attenzione oltre che su Mycobacterium tuberculosis su altri micobatteri denominati "atipici", conosciuti anche come micobatteri non tubercolari o MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis). I MOTT vengono classificati nella cosiddetta "Classificazione di Runyon"(2).



Figura 4. Robert Koch.

Mycobacterium tuberculosis complex

Il raggruppamento Mycobacterium tuberculosis complex comprende le specie Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis. A queste si associano per caratteristiche microbiologiche ed omologia del DNA Mycobacterium microtii, patogeno per roditori, Mycobacterium africanum, rara causa di tubercolosi in Africa e Mycobacterium canettii. Il bacillo di Calmette-Guérin o Mycobacterium bovis-BCG utilizzato nelle pratiche vaccinali viene considerato Mycobacterium bovis attenuato nella sua virulenza mediante circa 230 passaggi su patata biliata, terreno di crescita reso sfavorevole dalla presenza di bile ad elevata concentrazione.

Mycobacterium tuberculosis (detto anche hominis) è da sempre un protagonista importante nella patologia umana in quanto responsabile della tubercolosi polmonare e di altre forme non meno importanti di tubercolosi interessanti distretti corporei diversi come rene, apparato osseo, cute.

L'uomo è l'unico serbatoio di *Mycobacterium tuberculosis* che è patogeno anche per la cavia, per il criceto e (meno) per il coniglio. Risulta essere resistente agli agenti chimici e fisici e si può considerare infatti il più resistente fra i batteri patogeni non sporigeni. Sopravvive a lungo nell'ambiente esterno; soprattutto se al riparo dalla luce, resiste al calore secco a 100 °C per due ore e nelle soluzioni acide e alcaline, mentre è inattivato in poche ore dalla luce solare diretta o dal calore umido a 60 °C per 30 min. E' sensibile alle soluzioni disinfettanti iodurate.

Gruppo di Runyon	Microrganismi più importanti
I gruppo Fotocromogeni	
Micobatteri cromogeni con produzione di un pigmento carotenoide giallo quando le colonie vitali vengono esposte ad una luce intensa	M. simiae M. marinum M. szulgai M. kansasii
II gruppo Scotocromogeni	
I micobatteri formano colonie intensamente colorate	M. scrufolaceum
in giallo sia alla luce che al buio.	M. gordonae
In alcune specie la produzione di pigmento può essere	M. xenopi
incrementata con la esposizione alla luce	M. flavescens
III gruppo Non Fotocromogeni	
Micobatteri non cromogeni dopo esposizione alla luce o	M. intracellulare-avium
Micobatteri che non intensificano la scarsa produzione di	M. haemophilum
pigmento dopo esposizione alla luce	M. terrae
1.9	M. gastri
	M. triviale
	M. malmoense
IV gruppo Rapida crescita	
Micobatteri a rapida crescita con colonie che si sviluppano	M. fortuitum
già dopo 3-5 giorni, possono essere pigmentati o non pigmentati.	M. chelonei

Tabella 2.1.1. Classificazione di Runyon.

Classificazione di Runyon

La classificazione di Runyon, concepita già dal 1954 da Runyon e Timpe e divenuta operativa nel 1959 (2), è una classificazione estremamente utile dal punto di vista diagnostico in quanto basata su criteri semplici, quali velocità di crescita sui terreni all'uovo a 37 °C e pigmentazione delle colonie quando esposte alla luce (fotocromogeni) o quando coltivate in condizioni di oscurità (scotocromogeni) o mancanza di pigmento (non cromogeni) (Tabella 2.1.1). Tutti que-

sti microrganismi differiscono da Mycobacterium tuberculosis per la loro ubiquitarietà ("free-living organisms"), per la loro trasmissibilità da un individuo all'altro e per la loro maggiore resistenza ai farmaci antitubercolari.

La classificazione di Runyon ha avuto un grande valore storico in passato e ancora adesso, pur nei suoi limiti interpretativi e classificativi, rappresenta un valido elemento diagnostico per il riconoscimento e la caratterizzazione dei micobatteri. Tuttavia oggi, per la identificazione di questi microrganismi, si fa riferimento ad altre metodologie di lavoro, soprattutto di biologia molecolare, con risultati sorprendenti sia in termini di tempo che di accuratezza analitica.

Proprio tali metodologie di lavoro estremamente rigorose nella speciazione hanno evidenziato che i confini fra le varie specie di micobatteri tipici e atipici sono sfumati e a volte mal definiti, tanto da ritenere che possa avere più importanza il complesso di specie nel quale il batterio è compreso, piuttosto che la specie singola. Questo cosiddetto "complesso di specie" è ormai assurto a valore di unità tassonomica (Tabella 2.1.2).

COMPLESSO	SPECIE	
M. tuberculosis complex:	M. tuberculosis (hominis) M. bovis M. africanum M. microti M. canettii	
M. avium complex (altri nomi: MAI, MAIC)	M. avium M. intracellulare M. xenopi	
M. scrofulaceum complex	M. scrofulaceum M. simiae	
M. kansasii complex	M. kansasii M. gastrii	
M. fortuitum complex	M. fortuitum M. chelonei	
M. gordonae complex	M. gordonae M. szulgai	
M. terrae complex	M. terrae M. non chromogenicum M. triviale	

Tabella 2.1.2. Complessi di specie di Micobatteri di maggiore rilevanza in Micobatteriologia.

3. Caratteristiche morfologiche, strutturali e di crescita dei micobatteri

I micobatteri sono microrganismi aerobi o microaerofili, immobili, asporigeni. Possono essere presenti sul suolo, nell'acqua e possono parassitare alcune specie animali che fungono pertanto da serbatoio. La morfologia è quella tipica di bacilli allungati delle dimensioni di circa 2-5 μm , un po' incurvati, presenti talora in forme cocco-bacillari con un diametro trasverso di circa 0,2-0,5 μm .

La parete batterica presenta una struttura particolare, molto ricca di lipidi (oltre il 60% del peso secco) con una concentrazione elevata di alcuni grassi composti chiamati micosidi formati a loro volta dall'esterificazione di acidi micolici, ovvero di acidi beta idrossilati a lunga catena satura (83-93 atomi di C), con zuccheri e glicoproteine. Altri grassi composti presenti nella parete batterica sono rappresentati dalle cere di cui si conoscono 4 gruppi: (A, B, C, D). Queste sono esteri di acidi grassi fra i quali lo stesso acido micolico con alcoli (1) (Figura 5).

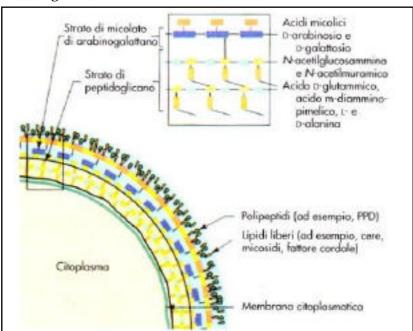


Figura 5. Struttura della parete cellulare dei micobatteri (Murray P.R. et al., 2000).

La particolare composizione lipidica della parete batterica insieme alla presenza di altri composti proteici e glicoproteici quali peptidoglicano, diaminopimelato, mannano, arabino-mannano, rende ragione delle particolari affinità tintoriali dei micobatteri e della loro lenta crescita, resistenza ai detergenti, resistenza ai più comuni antibiotici, antigenicità. Inoltre è responsabile della caratteristica alcool-acido resistenza alla base della colorazione di Ziehl Neelsen. Ricordiamo che l'acido resistenza è comune anche alla specie Nocardia.

Il tempo di duplicazione dei micobatteri è molto lento, fino a 12 - 18 ore per la divisione completa; questo determina caratteristiche colturali peculiari perché sono necessari tempi lunghi per produrre colonie visibili ad occhio nudo sui terreni di coltura.

4. Patogenesi e immunità della tubercolosi

La risposta immunitaria dell'ospite in corso di infezione tubercolare rappresenta un aspetto estremamente importante della malattia stessa, noto da lungo tempo con il nome di "Allergia Tubercolare". Oltre al principale meccanismo difensivo del paziente, rappresenta anche il meccanismo immunologico che caratterizza le varie forme di espressività clinica e istopatologica della malattia.

Per facilitare la comprensione di questi fenomeni immunologici che accompagnano sia l'infezione che la malattia tubercolare, è paradigmatico l'insieme dei processi umorali e tessutali che si verificano nella tubercolosi polmonare. Questa patologia oltre ad essere la più frequente (circa il 95% dei casi di tubercolosi) è anche quella che meglio descrive i rapporti fra i cambiamenti immunitari e le manifestazioni cliniche.

4.1 Meccanismi della Immunità tubercolare

La risposta immunitaria che si sviluppa nelle fasi iniziali della malattia tubercolare è una risposta prevalentemente di tipo cellulare (1). L'Immunità Cellulo-Mediata (ICM) ha come attore principale il macrofago alveolare attivato. La componente umorale anticorpopoietica è invece apparentemente scarsa e comunque di difficile valutazione per quanto riguarda l'efficacia dei suoi effetti.

Nella storia naturale dell'infezione nell'uomo, la penetrazione di *Mycobacterium tuberculosis* nei polmoni determina una sequenza di eventi. Dapprima compare flogosi di tipo essudativo con edema loco-regionale, iperemia e attivazione macrofagica; successivamente si sviluppa una componente cellulare reattiva tipica delle flogosi croniche produttive.

In questa primissima fase della infezione, la flogosi è di tipo essudativo con fenomeni polmonari locali di vasodilatazione, edema, produzione di essudato fibrinoso e presenza di polimorfonucleati, linfociti e monociti provenienti per stimoli chemiotattici dal torrente circolatorio. Il risultato finale dipende ovviamente dall'equilibrio raggiunto fra l'entità della flogosi con i suoi meccanismi di difesa e la carica batterica presente nel sito di infiammazione. Molte infezioni, infatti, possono risolversi proprio in questa fase con questi semplici meccanismi aspecifici di difesa locale e quindi senza intervento della immunità specifica umorale e cellulare. Nel caso, però, che le difese aspecifiche non siano state sufficienti a eliminare i micobatteri, l'infezione prosegue e la sua successiva evoluzione è condizionata dalla capacità dell'ospite di produrre una adeguata risposta immunitaria di tipo cellulomediato. E' infatti da tempo noto che la resistenza alle infezioni micobatteriche varia da individuo a individuo (2).

Come premesso, effettore principale di tale risposta è il macrofago alveolare specificamente sensibilizzato dal contatto con gli antigeni bacillari e con capacità fagocitarie ed enzimatiche tali da consentirgli di eliminare i micobatteri che ha fagocitato (3).

Nell'ambito della espressione di un meccanismo immunitario più complesso, il macrofago funziona come cellula di presentazione dell'antigene (APC), essendo in grado di processare l'antigene e di presentarlo ai linfociti esponendolo sulla propria membrana insieme agli antigeni del sistema maggiore di istocompatibilità di classe 2 (MHC class II antigens) e favorendo il cosiddetto riconoscimento associativo dell'antigene da parte del linfocita Thelper (linfociti CD4+ T citotossici). Il linfocita T così attivato prolifera e libera numerose linfochine e fattori chemiotattici (SMAF: Specific Macrophage Arming Factor; INF: Interferon gamma; MIF: Migration Inhibitor Factor ed altri) che determinano gli eventi immunitari successivi quali il rinforzo dei meccanismi di attivazione degli stessi macrofagi, che diventano più aggressivi, e il coinvolgimento immunitario dei linfociti B che sviluppano la loro specifica risposta umorale verso gli antigeni bacillari.

Le linfochine secrete nel sito di infezione producono inoltre anche una potente attivazione chemiotattica nei confronti di cellule ematiche mononucleate che si trasformano prima in macrofagi tessutali e in seguito in cellule giganti epiteliodi le quali, insieme ai fibroblasti tessutali contribuiscono alla formazione del "granuloma tubercolare". Le cellule epitelioidi, caratteristiche del granuloma tubercolare, sono macrofagi attivati. Le "cellule giganti di Langhans" sono invece il prodotto della fusione dei macrofagi disposti intorno all'antigene tubercolare con i nuclei in posizione periferica. Il granuloma rappresenta il tentativo di "murare" o isolare fisicamente i micobatteri per evitare la loro diffusione in altre sedi del polmone.

I linfociti T-helper CD4+ interessati al processo di attivazione dei macrofagi sono quelli che entrano in modo determinante nella complessa immunità dei micobatteri, ma anche i linfociti T CD8-suppressor sembra che abbiano una funzione importante. Essi favoriscono il rilascio dei micobatteri dai macrofagi inefficienti nel killing batterico e attiverebbero i granulociti neutrofili responsabili della definitiva eliminazione dei micobatteri (4). Il processo fibrosante che circonda e delimita i granulomi e che caratterizza la formazione del tubercolo è controllato dalla presenza di particolari monochine secrete dai macrofagi che attivano i fibroblasti quali Tumor Necrosis Factor-(TNF), Trasforming Growth Factor – (TGF) e Platelet Derived Growth Factor (PDGF).

Il processo di formazione del "tubercolo" rappresenta la fase finale più significativa della immunità cellulare ed è caratterizzata dallo sviluppo di una zona centrale, nella quale in genere sono contenuti i bacilli e le cellule mononucleate del sangue, che risulta poco vascolarizzata e soggetta facil-

mente a fenomeni necrotici la cui evoluzione naturale è la formazione di materiale caseoso. Questo materiale nella grande maggioranza dei casi può rimanere confinato nella sua sede all'interno del tubercolo in sintonia con la guarigione clinica della malattia, oppure può aprirsi all'esterno in sedi diverse del polmone e complicare l'evoluzione della malattia tubercolare.

Il tempo necessario per lo svolgimento di questo complesso processo infiammatorio, che si complica quasi sempre con una flogosi dei linfonodi ilari, è di circa 4-8 settimane e le relative lesioni isto-patologiche e radiologiche sono tipiche di un quadro clinico caratteristico conosciuto come complesso primario tubercolare o complesso di Ghon.

Gli individui con infezione tubercolare senza malattia in atto non sono considerati infettivi per la comunità. Essi però in una certa percentuale di casi (intorno al 5%) possono sviluppare una malattia tubercolare la cui evoluzione può essere molto diversa da individuo a individuo sulla base anche della intensità di intervento della ICM.

4.2 Il problema della Ipersensibilità ritardata

Un problema importante correlato alla ICM è quello della Ipersensibilità ritardata dell'infezione tubercolare (IR) conosciuta anche come Delayed Hypersensitivity (DHT), che caratterizza la cosiddetta "allergia tubercolinica" e che si sviluppa in genere dopo 4-8 settimane dalla infezione (periodo preallergico). Tale ipersensibilità può permanere nella memoria immunologica dell'ospite anche per tutta la vita, ed è responsabile della positività alle cutireazioni classiche per la diagnostica della malattia tubercolare.

La IR è una allergia di tipo cellulare, tipo IV della classificazione di Gell e Coombs, generata dagli stessi meccanismi immunitari che sostengono la ICM, da non confondere però con quest'ultima.

Per capire la non semplice differenza fra questi due fenomeni immunologici, IR e ICM, entrambi legati alla attivazione dei linfociti T ed alla produzione delle loro linfochine, che a loro volta chiamano in causa i macrofagi ed altri linfociti, bisogna considerare l'influenza che ha sull'ospite la concentrazione loco-regionale degli antigeni micobatterici, nonché le caratteristiche di aggressività degli stessi bacilli.

Una bassa concentrazione di bacilli è in grado di modulare la risposta immunitaria cellulare attraverso meccanismi funzionalmente idonei a determinare il killing dei micobatteri e quindi la loro eliminazione. Quando le concentrazioni batteriche sono elevate, si determina invece la notevole amplificazione della risposta immunitaria senza che peraltro tale processo comporti una eliminazione dei bacilli stessi. In altre parole, tutto il sistema immunocellulare funziona ad un ritmo per così dire esagerato rispetto all'entità del fenomeno infettivo, rendendosi responsabile di quei fenomeni caseosi e colliquativi che sono tipici delle lesioni istologiche tubercolari (2). Pertanto la

ICM viene considerata come un fenomeno protettivo ed effettivamente benefico nella economia globale della malattia, mentre la IR funziona come un acceleratore o amplificatore della ICM, e quindi come un fenomeno di fatto negativo e sovradimensionato rispetto alle effettive necessità di risposta dell'ospite.

I due fenomeni inoltre sono in genere coesistenti, con prevalenza dell'uno o dell'altro, ma proprio il bilanciamento di questi due sistemi comporta la successiva evoluzione della malattia verso la guarigione (prevalenza della ICM) oppure verso la formazione di estesi fenomeni istolesivi e colliquativi con quadri drammatici di tubercolosi cavitaria (prevalenza della IR) (5).

4.3 Test Tubercolinici e Anergia

In corso di tubercolosi le cellule di tipo monocito-macrofagico non sempre hanno un effetto difensivo tipico della immunità cellulare. Talvolta alcuni antigeni micobatterici sono in grado di stimolare particolari popolazioni monocitarie (Fc-gamma-R+) che hanno una scarsa attività di presentazione degli antigeni di istocompatibilità oltre ad inibire la risposta linfoproliferativa ai fitogeni (6). Tali monociti producono una Interleuchina 1 con spiccata attività immunosoppressiva nei confronti della espansione della popolazione di linfociti T helper-inducer importanti per lo sviluppo della reazione cellulare immunitaria (7).

In altre parole i micobatteri durante l'invasione dell'ospite mettono in atto una serie di meccanismi offensivi che sono legati in parte direttamente alla virulenza del loro soma batterico e in parte alla loro capacità di produrre una riduzione delle difese cellulari dell'ospite. Quando questo processo di immunoinibizione è presente nella sua massima espressività, oppure quando esistono concomitanti condizioni infettive in grado di inibire la risposta immuno-cellulare come malattie esantematiche o neoplastiche, il paziente diventa "anergico", cioè incapace di produrre una risposta cellulare adeguata nei confronti della invasione bacillare. Tale condizione di anergia viene svelata dalla negatività della cutireazione tubercolinica.

Le cutireazione tubercolinica è, infatti, un test cutaneo espressione della presenza dei fenomeni immunologici connessi con ICM e IR. Questa prova può essere eseguita inoculando nel derma del paziente, con metodologie diverse, una quantità standard di PPD (Purified Protein Derivative) che corrisponde ad una miscela di costituenti proteici a basso peso molecolare (circa 10.000 Dalton) e di costituenti lipidici e polisaccaridici, estratta da un filtrato di brodocoltura di Mycobacterium tuberculosis.

La storia di questo prodotto risale a molti anni addietro quando la cosiddetta vecchia tubercolina di Koch (AT = Alt Tuberkulin), scoperta dal ricercatore polacco Bujwid nel 1891 che la battezzò "linfa di Koch", era ottenuta in seguito a filtrazione in autoclave di lisati di colture di 6-8 settimane in brodo glicerinato di *Mycobacterium tuberculosis*. Questa vecchia tubercolina di Koch era costituita però da un ampio numero di molecole eterogenee di difficile standardizzazione e conservazione. Negli anni successivi, secondo e terzo decennio del secolo scorso, la ricercatrice Florence Siebert svolse una serie di studi per purificare meglio tale prodotto mediante precipitazione con acido tricloro-acetico e il risultato finale portò alla sintesi dell'attuale PPD attualmente utilizzato per le indagini di massa di cutireazione tubercolinica e adottato in tutto il mondo sulla base di direttive specifiche dell'OMS.

Il PPD possiede una attività circa 500 volte superiore alla AT e l'OMS ha stabilito di assumere come unità tubercolinica internazionale (UT) mg 0,00002 di PPD corrispondenti a circa 0,01 di AT.

Le metodologie di inoculo (sulla superficie volare dell'avambraccio) sono varie e comprendono il test multipunture di Heaf, il Tine Test, la Intradermoreazione di Mantoux (8).

L'inoculo tubercolinico, una volta giunto nel derma, determina lo stesso tipo di risposta provocata nell'organismo sensibile dalla infezione naturale e cioè l'attivazione dei linfociti T con produzione di linfochine, l'attivazione macrofagica e la formazione di un infiltrato flogistico locale la cui evoluzione, nel giro di 48-72 ore, è legata alle condizioni immunitarie e infettive dell'ospite.

La reazione infatti viene considerata positiva quando il diametro dell'infiltrato supera i 2 mm intorno ad ogni punta del Tine Test o i 10 mm nella metodica secondo Mantoux. Nel test di Heaf a punture multiple esistono quattro gradi di positività del test a seconda della confluenza o meno delle papule e solo i gradi 3 e 4 corrispondono ad una positività certa.

La reattività positiva ad una cutireazione in un individuo sospetto di infezione tubercolare può suggerire ma non confermare una diagnosi di tubercolosi, così come l'estensione e la intensità dei fenomeni infiltrativi fino alla necrosi della papula possono essere in relazione alla intensità della malattia in atto. In ogni caso la valutazione del test deve essere sempre considerata con cautela in quanto la reattività personale dell'ospite, dall'ipersensibilità ritardata fino all'anergia, può giocare un ruolo molto importante che deve essere attentamente valutato dal punto di vista clinico. E' oggi ben definito il concetto che un test tubercolinico positivo si negativizza se il soggetto non è sottoposto a nuovi contatti con *Mycobacterium tuberculosis*. Inoltre non v'è rischio nel risottoporre un soggetto cute-positivo a nuovo test.

Nei pazienti HIV positivi si ha una progressiva diminuzione della reazione parallelamente al calo numerico dei CD4 (9).

4.4 Immunità umorale

Le infezioni da micobatteri sono in grado di stimolare una risposta umorale attraverso la produzione di immunoglobuline specifiche per alcuni antigeni micobatterici. Tali antigeni micobatterici sono indicati nella tabella 4.4.1.

Antigeni proteici (38, 19, 14, Kd) Antigeni glicolipidici (PGL 1, SL-IV) Antigeni immunodominanti (LAM - Lipoarabinomannano, 38 Kd) Antigeni globali (BCG, A60, PPD)

Tabella 4.4.1. Antigeni micobatterici.

Mentre gli antigeni proteici sono in genere scarsamente specifici perché presentano cross-reazioni con malattie autoimmuni, artriti, fibrosi polmonari etc., gli antigeni glicopeptidici sono, invece, poco usati dal punto di vista diagnostico. Il PGL 1, infatti, è tipico della lebbra lepromatosa, e l'SL-IV (2,3 diacil trealosio) sembra invece essere predittivo ad alto titolo in soggetti HIV positivi.

Gli antigeni LAM (Lipoarabinomannano) costituiscono un gruppo di sostanze peculiari della cellula batterica. La loro messa in evidenza può costituire un test diagnostico con buone caratteristiche di specificità e di sensibilità (10). Alla stessa stregua possono essere considerati gli antigeni globali (BCG, A60, PPD), la cui utilizzazione nel laboratorio di diagnostica micobatteriologica comincia ad essere considerato con un certo interesse.

Le immunoglobuline prodotte dai linfociti B nella tubercolosi hanno una funzione soprattutto opsonizzante e non sembrano giocare un ruolo protettivo importante nel problema della immunità della tubercolosi (8). Forse una funzione specifica sembra risiedere nel neutralizzare tutti quegli antigeni micobatterici che hanno attività immunosoppressiva nei confronti della ICM.

La valutazione dunque della immunità umorale della tubercolosi rimane ancora un problema non risolto dal punto di vista della effettiva utilità diagnostica in clinica, nonostante questo però, negli ultimi anni diverse aziende presenti sul mercato dei diagnostici, hanno proposto alcuni kit commerciali per il dosaggio di questi anticorpi specifici che hanno mostrato buone caratteristiche di sensibilità e specificità analitica.

4.5 Vaccinazione antitubercolare

La vaccinazione antitubercolare ha rappresentato fin dal lontano 1921, anno nel quale fu sperimentata in Francia, una misura molto importante di controllo della malattia tubercolare in quanto nei luoghi dove essa è stata applicata si è avuta una riduzione significativa della diffusione della malattia.

La vaccinazione antitubercolare viene eseguita inoculando per via intradermica un ceppo di bacillo di Calmette e Guérin (BCG). L'inoculo intradermico, eseguito in soggetti ovviamente tubercolino-negativi, produce un infiltrato locale in genere di modesta entità con interessamento delle linfoghiandole satelliti che nel giro di 2-4 settimane scompare lasciando nell'individuo uno stato di ipersensibilità ritardata che rappresenta l'arma di difesa immunologica che il soggetto utilizza quando viene a contatto con il bacillo tubercolare.

In molti casi però questa arma mostra una efficacia ridotta e gli individui possono comunque ammalare, il che sembra sia legato a vari fattori di difficile valutazione quali ad esempio la variabilità genetica dei soggetti vaccinati, oppure la particolare aggressività dei micobatteri presenti nelle varie parti del mondo o, ancora, l'uso di differenti ceppi di BCG per la immunizzazione.

Va comunque precisato che questi insuccessi vaccinali, oltre che alle cause suddette, potrebbero essere legati anche alla notevole complessità immunologica dei BCG, i cui antigeni, per motivi non del tutto noti, potrebbero rimanere mascherati nei confronti del sistema immunitario dell'ospite. Sono da valutare le formulazioni antigeniche nuove ottenute mediante la metodica del DNA-ricombinante. Queste potrebbero costituire i nuovi vaccini in grado di stimolare in modo specifico la IR al fine di ottenere la massima attività antibatterica senza indesiderabili effetti istolesivi concomitanti (11).

5. La clinica

Le manifestazioni cliniche della Tubercolosi sono strettamente correlate al modo con cui si sviluppa la risposta immunitaria del paziente e più precisamente alla entità della risposta cellulare (IR e ICM) che come è noto modula l'entità dei fenomeni isto-lesivi della malattia.

Questo rende ragione della presenza di quadri clinici estremamente diversi nei vari pazienti e ovviamente anche della particolare gravità che la malattia assume nei malati immunodepressi o con AIDS conclamato, laddove, in effetti, la tubercolosi da Mycobacterium tuberculosis o da Mycobacterium avium complex può rappresentare una complicanza abbastanza frequente e difficile da gestire.

Altri fattori di non secondaria importanza influenzano la clinica della malattia tubercolare, fra i quali:

-l'età del paziente: i bambini fino a due anni sono molto suscettibili a forme miliari o meningee.

-il sesso: le donne mostrano indici di prevalenza minori rispetto all'uomo fino all'età di 45-50 anni.

-la nutrizione: l'indigenza e la malnutrizione riducono la resistenza alla malattia.

-i fattori tossici: il fumo e l'alcool rappresentano fattori favorenti.

-le patologie croniche e infettive: diabete, insufficienza renale, infezione da HIV rappresentano fattori che incidono notevolmente sulla gravità della malattia.

La trasmissione della malattia tubercolare avviene per contagio interumano in ambienti preferibilmente chiusi e sovraffollati e gli organi bersaglio sono rappresentati dall'apparato polmonare che incide per circa il 95% delle infezioni e da altri organi quali i reni, le ossa, la cute e i linfonodi, ma in via ipotetica qualunque distretto dell'organismo può essere colpito.

Dal punto di vista clinico è opportuno distinguere un primo quadro sintomatologico dovuto alla formazione del cosiddetto complesso primario di Ghon il quale si manifesta soprattutto nei bambini con una sintomatologia modesta e di difficile interpretazione caratterizzata da lieve astenia, inappetenza, modesta febbricola e talvolta tosse. Prova della passata esperienza infettiva è costituita dalla positività del test cutaneo tubercolinico.

Il corrispettivo anatomo-patologico, come già evidenziato in precedenza, è caratterizzato da un focolaio di necrosi caseosa a livello polmonare e da un interessamento flogistico dei linfonodi peribronchiali regionali che esprime il quadro della adenopatia ilare satellite.

Da queste lesioni polmonari i bacilli passano nel circolo ematico sotto



forma di gittate batteriemiche diffondendo in diversi organi quali milza, fegato, reni, ossa ed anche altri distretti, senza provocare in genere lesioni granulomatose, né tanto meno una sintomatologia correlata. Tale diffusione setticemica si interrompe quando il bambino guarisce dal complesso primario.

L'aspetto radiologico delle lesioni in questo periodo, a livello polmonare, può essere poco significativo. Le lesioni parenchimali, infatti, possono essere quasi completamente assenti mentre quelle linfoghiandolari possono dare una immagine nel torace di un focolaio linfoadenitico ilo-mediastinico aspecifico accompagnato da un modesto ingrandimento dell'ilo e dei linfonodi paratracheali.

Nelle forme ad espressione morfologica completa, invece, il focolaio parenchimale può apparire sotto forma di una opacità di grandezza variabile, modicamente denso, omogeneo a margini sfumati, mentre il focolaio linfoadenitico può presentarsi come una opacità densa ed omogenea con margini netti che sporgono dal contorno mediastinico.

Nella maggior parte dei giovani pazienti queste lesioni si risolvono spontaneamente anche se con lentezza, e nel frattempo si consolida il meccanismo immunitario della ipersensibilità ritardata con positività alla cutireazione tubercolinica, e relativo sequestro dei bacilli nelle aree infette calcificate nelle quali però possono rimanere vivi per lungo tempo.

In quest'ultima fase risolutiva l'aspetto radiologico del complesso primario è tipico in quanto la regressione dell'infiltrato perifocale inizia per lo più da una zona equidistante dai focolai parenchimale e linfonodale, così che viene a crearsi una caratteristica immagine "bipolare" con due aree ben delineate di infiltrazione granulomatosa che sono appunto quella parenchimale e quella linfonodale. Accentuandosi la risoluzione della quota di infiltrazione nelle aree suddette, accade che i due focolai risultino collegati fra loro da una sottile opacità a stria riferibile ad una immagine linfangitica, e proprio tale quadro corrisponde all'aspetto radiologico più tipico del complesso primario di Ghon nella sua fase di risoluzione.

Se questo, dunque, è l'andamento più comune del complesso primario tubercolare nel bambino e nell'adulto con prima infezione, le situazioni possono talvolta avere espressività clinica diversa per l'aggravamento delle lesioni istologiche polmonari.

Infatti, in tali situazioni, può accadere che il materiale caseoso contenuto nel focolaio primitivo possa aprirsi nella cavità pleurica adiacente formando un versamento imponente e rendendo il polmone parzialmente atelectasico, oppure questo materiale può aprirsi in una cavità bronchiale, scivolare lungo il decorso del bronco e formare una lesione polmonare estesa con un aspetto radiologico cosiddetto di "cavità a parete sottile" che può dare seri problemi di asfissia intensa nei bambini qualora ad essere interessati siano i due bronchi principali.

Un'altra complicanza possibile coinvolge i linfonodi ilari e peri-ilari già interessati dal processo flogistico che possono fondersi fra loro in una unica massa caseosa o in gruppi linfo-ghiandolari caseosi, con manifestazioni cliniche di una tubercolosi linfo-polmonare nella quale l'intensa adenomegalia può determinare compressione delle vie aeree broncoalveolari con pericoli di dispnea intensa fino all'asfissia.

Nel caso di infezioni primarie in bambini molto piccoli o in individui HIV positivi con forte compromissione immunologica, può accadere anche che la diffusione bacillifera che si verifica durante il complesso primario possa determinare una tubercolosi nodulare ad aspetto miliariforme o una meningite tubercolare, situazioni queste che corrispondono ad una complicanza molto grave della malattia con prognosi per lo più infausta.

Ovviamente, molti di questi quadri clinici piuttosto drammatici rappresentavano in passato, cioè in era preantibiotica, una evoluzione abbastanza normale della malattia. Oggi, in realtà, è più difficile trovare situazioni cliniche di questo genere, anche nei paesi in via di sviluppo. Dovunque si è infatti cercato di attuare procedure valide e corrette di controllo della malattia tubercolare.

La tubercolosi polmonare post-primaria rappresenta, invece, il quadro clinico di una infezione tubercolare che colpisce un individuo già precedentemente affetto da tubercolosi primaria. Può presentarsi sotto due forme diverse sulla base dello stato di recettività immunologica del paziente al momento della infezione. La prima forma è quella di una tubercolosi miliare con lesioni tipiche di una flogosi produttiva; la seconda forma è quella di una tubercolosi nodulare con i caratteri di una flogosi essudativa.

E' importante sottolineare che la forma post-primaria costituisce la manifestazione più importante della tubercolosi perché la positività dell'escreato di questi malati rappresenta la principale sorgente di infezione della malattia all'interno della comunità nella quale il malato stesso vive.

La tubercolosi post-primaria può essere determinata, dal punto di vista patogenetico, da tre cause fondamentali:

-Trasformazione nel tempo di una lesione primaria in una post primaria senza alcuna soluzione di continuo nel senso che le lesioni del complesso primario si fondono con gli eventi isto-patologici del complesso post-primario.

-Riattivazione endogena di una lesione primaria quiescente intervenuta per ragioni particolari come, ad esempio, la caduta delle difese immunitarie per malnutrizione, per un parto distocico o per altre malattie intercorrenti.

-Reinfezione esogena determinata dalla penetrazione di una rilevante carica bacillare in un paziente biologicamente guarito da tubercolosi primaria e della quale conservi in modo stabilizzato una risposta immunitaria con i meccanismi della ipersensibilità ritardata.

Le due forme di espressione clinica e anatomo-patologica della tubercolosi post-primaria sono, come è stato già detto, quella della tubercolosi miliare con un carattere prevalentemente produttivo e quella della tubercolosi nodulare ad impronta invece prevalentemente essudativa.

La tubercolosi miliare è caratterizzata dalla diffusione di emboli batterici, per via ematogena, dal focolaio principale con formazione di lesioni produttive in ampie zone polmonari e extra-polmonari, nelle quali è evidente una reazione granulomatosa cellulo-mediata che rappresenta il tentativo più o meno efficace della ICM di fermare o di porre una barriera allo sviluppo dei focolai flogistici. La tubercolosi nodulare, invece, si determina quando esiste nel paziente una caduta dei meccanismi difensivi della ICM, con produzione nei focolai flogistici di intensi fenomeni essudativi ricorrenti e diffusione linfatica dei micobatteri, e una rapida tendenza alla caseosi con evoluzione cavitaria. I meccanismi di intervento della ICM risultano poco espressi e l'evoluzione è quella di una mancanza di reazione locale con scarsa tendenza alla delimitazione della infezione.

Senza voler entrare nel merito di differenziazioni più fini delle forme tubercolari adesso descritte per le quali si rimanda ai trattati specifici, vale la pena ricordare che sia la tubercolosi miliare che quella nodulare possono dare lesioni polmonari circoscritte o diffuse, e possono avere una evoluzione progressiva o regressiva con un andamento di tipo acuto, subacuto o cronico.

In ogni caso entrambe le forme, ma soprattutto quella nodulare, possono produrre fenomeni istolesivi intensi la cui espressione più tipica è rappresentata dalla caverna tubercolare e dalle conseguenti retrazioni fibrotiche intense del parenchima e del mediastino.

La caverna tubercolare si forma quando la lesione tende a progredire e il materiale caseoso liquefatto si scarica in un bronco svuotando così l'area precedentemente necrotica. La cavità è costituita da un terreno particolarmente favorevole allo sviluppo di *Mycobacterium tuberculosis*, che per via bronchiale può colonizzare altre parti del polmone o può essere emesso all'esterno con la tosse ed infettare altri individui (tubercolosi aperta).

Negli adulti le lesioni tubercolari insorgono soprattutto nei campi polmonari superiori perché questi sono più ossigenati. La sintomatologia in queste condizioni è quella tipica di una infezione respiratoria acuta con sintomi generici riferibili ad una febbricola serotina, malessere generale e profonda astenia con facile sudorazione. Nell'eventualità di situazioni più critiche e complicate i sintomi diventano più rilevanti, può insorgere febbre intensa con tosse produttiva ed emoftoe ed un dolore toracico costante dovuto a compromissione pleurica. In queste condizioni il paziente, se non trattato adeguatamente, va incontro ad un progressivo deterioramento delle sue condizioni generali con dimagramento intenso, presenza di un evidente pallore della cute associato ad intensa dispnea e un aspetto generale che esprime uno stato di profonda sofferenza fisica.

Dal punto di vista radiologico si possono avere situazioni molto diverse. Da lesioni poco significative di modesta compromissione della trama broncoalveolare del polmone, si può arrivare a lesioni più tipiche quali ad esempio opacità irregolari o nodulari dei campi polmonari superiori, oppure a cavitazioni singole o multiple più o meno confluenti o, infine, ad opacità calcifiche nodulari sul profilo dell'albero bronchiale. In ogni caso la corretta interpretazione dei quadri radiologici necessita di molta esperienza e questo conferma la necessità di avere sempre più elementi diagnostici di valutazione per arrivare ad una diagnosi corretta di tubercolosi polmonare.

La ricerca del BK nell'espettorato o nel broncoaspirato, rappresenta un fattore di certezza clinica della malattia che, insieme ad altri elementi di valutazione, rappresenta un dato importante per la diagnosi finale di tubercolosi polmonare.

Le lesioni polmonari descritte, se il paziente sopravvive, possono guarire dopo circa un anno o due, evolvendo in fibrosi oppure nella formazione di tessuto cicatriziale complicato talora da aree di calcificazione interna.

Successivamente i processi fibrotici possono essere responsabili di retrazioni estese del parenchima polmonare che deformano la morfologia normale di organi come la trachea o il mediastino oppure gli stessi processi fibrotici possono danneggiare le pareti bronchiali dei piccoli e medi bronchi determinando estese bronchiectasie.

Oggi generalmente la prognosi della tubercolosi post-primaria non complicata è migliore di quanto non lo fosse in passato in relazione, ovviamente, all'attuazione tempestiva del razionale trattamento chemioterapico.

6. La diagnostica di laboratorio della tubercolosi

La diagnostica di Laboratorio della tubercolosi si basa ancora oggi, fondamentalmente, sulla esecuzione di alcune semplici indagini di microbiologia simili a quelle che venivano effettuate nel secolo scorso agli albori della malattia, vale a dire la ricerca diretta di *Mycobacterium tuberculosis* nel campione con una colorazione di Ziehl-Neelsen e la sua identificazione in specifici terreni di coltura.

Ovviamente questa considerazione di massima va interpretata, nel senso che, se pur esiste una similitudine di procedure, è anche vero che oggi esiste una migliore standardizzazione delle metodologie di lavoro ed i materiali diagnostici sono notevolmente migliorati, soprattutto per quanto riguarda la composizione dei terreni solidi e liquidi e di quelli antibiotati. Sono inoltre disponibili ormai test di biologia molecolare, eseguibili direttamente sul materiale patologico, che consentono di raggiungere maggiori livelli di certezza nella identificazione batterica.

6.1 La raccolta del campione

I campioni da inviare al laboratorio in caso di sospetta tubercolosi a localizzazione polmonare sono l'espettorato, l'espettorato indotto, l'aspirato gastrico, il broncoaspirato, il liquido di lavaggio broncoalveolare, la spazzolatura bronchiale, l'aspirato transtracheale. Viene richiesto dal laboratorista un minimo di 3 campioni raccolti al mattino in 3 giorni consecutivi in quantità superiore a 5-10 ml. Sono da considerare non idonei i campioni salivari o quelli raccolti nell'arco della giornata (1,2).

L'aspirato gastrico, cui si ricorre per quei pazienti, come i bambini, che non riescono ad espettorare deve essere tamponato immediatamente con carbonato sodico (100 mg). Per i campioni la cui raccolta avviene con metodiche invasive viene richiesto un solo campione per paziente ed in quantità non inferiore a 5 ml. E' bene eseguire sempre la decontaminazione e la semina entro poche ore dalla raccolta. Pur essendo ormai accertato che i micobatteri conservano la loro vitalità a +4 °C per un massimo di 4 giorni (2), è raccomandabile processare il campione entro 48 ore.

6.2 Fluidificazione e Decontaminazione

L'esame colturale dei micobatteri presenta delle peculiarità in quanto il loro lungo tempo di duplicazione, associato alla concomitante presenza nei materiali patologici di altri microrganismi contaminanti, rende necessario un trattamento di decontaminazione del campione, finalizzato all'eliminazione della flora microbica non micobatterica. Questo trattamento di decontaminazione, che implica l'uso di soluzioni acide e alcaline forti, può essere eseguito sul campione biologico senza ledere la integrità dei micobatteri in quanto l'alto contenuto lipidico della loro parete batterica li rende molto resistenti all'azione degli agenti decontaminanti.

Se si considera inoltre che il 70-80% dei campioni che giungono nel laboratorio di micobatteriologia è rappresentato da espettorati, si comprende come oltre al trattamento di decontaminazione del campione debba essere eseguito anche un trattamento di fluidificazione che renda lo stesso campione libero da tralci muco-proteici. Questi infatti, durante la coltura, potrebbero intrappolare e nascondere eventuali micobatteri e quindi dare false negatività

In genere la decontaminazione e la fluidificazione avvengono contemporaneamente perché molti agenti decontaminanti sono anche fluidificanti; ma è possibile anche separare i due processi secondo procedure chimiche diverse e ben standardizzate.

In tabella 6.2.1 sono indicati i principali composti chimici in grado di essere utilizzati nelle procedure di decontaminazione e fluidificazione. Fra queste quella eseguita con N-acetil-cisteina e NaOH 2% secondo Kubica (1,2) è molto utilizzata nei laboratori di micobatteriologia e può essere considerata come metodo di riferimento per la coltura dei micobatteri. Infatti, se eseguita perfettamente, l'incidenza delle contaminazioni delle colture è contenuta mediamente sotto il valore del 5%. Poiché alcune sostanze decontaminanti come NaOH 4%, 3%, o acido ossalico 5% possono inattivare completamente o danneggiare gravemente i micobatteri presenti nel campione, riducendo od eliminando completamente la possibilità di un loro isolamento, in laboratorio si preferisce l'uso di decontaminanti più blandi anche se ciò comporta maggiori probabilità di contaminazione (1).

La tecnica di Kubica prevede un contatto per circa 15 minuti di uguali volumi del campione in esame (non più di 10 ml) e della soluzione decontaminante preparata in precedenza e costituita da NaOH 2% miscelata in parti uguali con citrato di sodio anidro 2,6% e addizionato con N-acetil-L-cisteina in ragione dello 0,5%.

Terminata la miscelazione del campione con la soluzione decontaminante è necessario vortexare più di una volta per favorire la fluidificazione.

Dopo il tempo di contatto la soluzione fortemente alcalina viene tamponata aggiungendo pari volume di tampone fosfato 0,067 M a pH 6,8, quindi si centrifuga per 15-20 min. almeno a 3000 x g, e il supernatante viene decantato. La fase di centrifugazione è importantissima perché serve ad aumentare considerevolmente la percentuale di positività dell'esame colturale (3). Nella fase successiva si risospende il sedimento con 1-2 ml di albumina bovina 0,2%. Questa sospensione, molto concentrata di potenziali micobatteri,

sarà utilizzata sia per l'esame microscopico diretto che per la semina dei terreni solidi e liquidi ed eventualmente per l'amplificazione.

Sostanze	Indicazioni	Limiti	
N-Acetil-L-Cisteina NaOH 2% (NALC con NaOH) Soluzione lievemente decontaminante con N usato come sostanza mucolitica per lisare il Il limite di esposizione al NaOH è di 15 mir		muco.	
Ditiotreitolo con NaOH 2%	Il NaOH al 2% è un ottimo fluidificante e mucolitico Il ditiotreitolo è costoso e il limite di esposizione è rigorosamente di 15 min.	Lesivo per i micobatteri	
Fosfato trisodico 13% con Cloruro di benzalconio	Preferibile per quei laboratori che non vogliono controllare il tempo di esposizione alla soluzione di decontaminazione.	Non utilizzabile con terreni privi di uova come i terreni sintetici	
NaOH 4%	Soluzione tradizionale per la decontaminazione e la fluidificazione di materiali fortemente inquinati. Il tempo di esposizione deve essere accuratamente controllato e non superare i 15 min.	Lesivo per i micobatteri	
Acido Ossalico 5%	Molto utile per campioni contaminati con P. aeruginosa	Lesivo per i micobatteri	
Cloruro di cetilpiridio 1% con NaCl 2%	Efficace soluzione di decontaminazione per i campioni di espettorato inviati da pazienti esterni al Laboratorio. I bacilli possono vivere anche per 8 gg. nella soluzione senza perdere la vitalità	Procedura complessa	

Tabella 6.2.1. Sostanze usate per le procedure di decontaminazione e flui - dificazione dei campioni.

6.3 Esame batterioscopico

L'esame batterioscopico diretto dei micobatteri viene eseguito preparando uno striscio del materiale biologico su di un vetrino perfettamente pulito e ben identificato ed eseguendo una colorazione specifica basata sul principio dell'alcool-acido resistenza. Questa proprietà, che assume per i micobatteri una rilevanza diagnostica particolare, senza riscontro in altri settori della batteriologia, è correlabile alla particolare concentrazione lipidica della parete batterica. Da un punto di vista operativo è sempre bene preparare in doppio i vetrini. Infatti in questo modo è possibile dileguare eventuali dubbi sorti alla lettura del primo vetrino o sopperire ad errori tecnici. Gli strisci – preparati ovviamente dal sedimento prima della risospensione dello stesso e fissati al calore - non devono subito essere colorati ma è bene sterilizzarli tenendoli sotto cappa a raggi UV overnight (1).

Le colorazioni alcool-acido resistenti generalmente utilizzate nei laboratori di micobatteriologia sono la colorazione di Ziehl-Neelsen, la colorazione a freddo di Kinyoun e la colorazione in fluorescenza con auramina e rodamina. Tutte queste colorazioni si basano sulla proprietà dell'acido-alcool resistenza. Infatti il primo colorante penetra in tutte le strutture batteriche presenti nel preparato, ma formerà doppi legami solo con gli acidi grassi della

parete dei micobatteri per cui questi resisteranno alla decolorazione. Il secondo colorante penetrerà solo in quelle cellule batteriche che con la decolorazione hanno perduto il primo colore.

La colorazione di Ziehl-Neelsen è la più classica fra le metodiche di colorazione dei micobatteri. Il colorante principale è la fucsina fenicata di Ziehl (3 g di fucsina in 100 ml di etanolo al 95%, con aggiunta di 10 volumi di soluzione di fenolo al 5%), che viene aggiunta gradatamente in modo da coprire tutta la superficie del vetrino. Questo viene poi riscaldato su becco Bunsen fino alla produzione di una leggera nuvola di vapore (fase in cui si possono creare dei pericolosi aerosol se non si è provveduto alla sterilizzazione dello striscio). Si attendono 5 minuti e quindi il preparato viene lavato e decolorato prima con acido solforico al 20%, e poi con alcool al 90% o HCl concentrato in etanolo al 95%. Si contrasta infine con blu di metilene per 30 secondi.

La colorazione di Kinyoun è simile a quella di Ziehl-Neelsen con la differenza sostanziale che la colorazione non avviene a caldo. Viene utilizzata la carbofucsina di Kinyoun (4 gr. di fucsina basica in 20 ml di etanolo al 95%) con aggiunta di 100 ml di H_2O distillata in cui sono stati sciolti a caldo 8 gr. di fenolo in cristalli (2).

La colorazione di Ziehl-Neelsen e la colorazione di Kinyoun permettono una ottima definizione della morfologia batterica. All'esame microscopico, ad un ingrandimento di 1000x ad immersione, i bacilli tubercolari appaiono colorati in rosso con disposizione variabile a singoli elementi o a piccoli gruppi disposti con un aspetto a mazzo di sigari o a palizzata su un fondo bluastro (Figura 6).

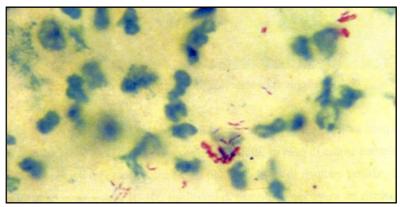


Figura 6. Micobatteri colorati con tecnica Ziehl-Neelsen.

In seguito a queste colorazioni spesso i micobatteri assumono una colorazione discontinua con alternanza nella stessa cellula di zone più o meno colorate, soprattutto in corrispondenza di alcune granulazioni dette granuli di

Much. Tali elementi sembrano essere accumuli di materiale di riserva e sono evidenziabili anche con la colorazione di Gram. In questo caso i micobatteri mantengono la colorazione violetta soprattutto in corrispondenza di detti granuli.

La colorazione con auramina-rodamina è basata sullo stesso principio delle colorazioni precedenti; il colorante principale è un fluorocromo, nella fattispecie una miscela di auramina-rodamina che penetra nella parete batterica e resiste alla sua eliminazione dopo trattamento con una soluzione mista di acido e alcool (0,5 di HCl concentrato in 100 ml di etanolo al 70%). Il colorante di contrasto è rappresentato da una soluzione di permanganato di potassio al 5%. La miscela viene fatta agire per 15 minuti mentre si lascia il permanganato per 2 minuti. La miscela utilizzata contiene 1,5 gr. di auramina O, 0,75 gr di rodamina B, 10 ml di fenolo in 75 ml di glicerolo a cui si aggiungono 50 ml di $\rm H_2O$ distillata. I componenti devono essere ben mescolati con un agitatore magnetico per 24 ore, oppure riscaldati ed agitati vigorosamente per 5 minuti. La miscela deve essere tenuta al buio (1).

Con questa colorazione il preparato microscopico va osservato in fluorescenza con un filtro a luce blu senza immersione e ad un ingrandimento di 400x. In questo modo si ha un maggior campo microscopico di osservazione e in tali condizioni i bacilli, se presenti, appaiono fluorescenti giallo-arancio in campo oscuro (Figura 7).

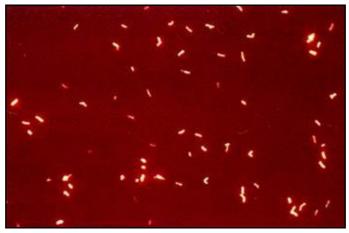


Figura 7. Micobatteri colorati con tecnica auramina-rodamina.

Questo tipo di colorazione risulta molto vantaggioso soprattutto per quei laboratori di microbiologia che hanno grosse routine di lavoro, in quanto la visione del preparato con un campo microscopico così ampio permette una esplorazione del vetrino più completa e rapida con una miglior accuratezza analitica. In caso di riscontro positivo si può passare alla colorazione di Ziehl-

Neelsen sullo stesso preparato per confermare la presenza dei micobatteri.

Il valore diagnostico dell'esame microscopico diretto va opportunamente valutato sia nel caso di un risultato negativo che positivo. Infatti un esame negativo non ha sempre il valore di una negatività reale del campione, perché potrebbe trattarsi di un campione paucibacillare con una concentrazione di micobatteri per ml molto bassa, inferiore a 10⁴ bacilli per ml, valore considerato soglia per una lettura positiva del campione. Pertanto la negatività letta può risultare una falsa negatività. Si stima che sia necessario una concentrazione compresa tra 10³ e 10⁴ microrganismi per ml di espettorato perché lo striscio diretto risulti positivo, mentre sono sufficienti 10-100 microrganismi per ml per l'isolamento in coltura (1). Lo stesso vale per il risultato positivo in quanto tale positività non significa necessariamente positività per il bacillo tubercolare. Infatti anche i micobatteri cosiddetti atipici o non tubercolari (MOTT) sono alcool-acido resistenti e quindi, nel caso di loro presenza, la positività microscopica sarebbe una falsa positività per il bacillo tubercolare. Inoltre anche microrganismi quali Nocardia, Rhodococcus, Legionella micdadei, cisti di Cryptosporidium spp., e Cyclospora mostrano vari gradi di acido-alcol resistenza. Bisogna d'altra parte considerare che con il solo esame microscopico non è possibile valutare la vitalità dei micobatteri osservati. Infatti campioni positivi all'esame microscopico, provenienti da pazienti in terapia, possono dare colture negative (2).

BAAR osservati	Metodo di lettura	Refertazione
0	Negativo per BAAR	_
1-2/300 campi	Numero osservato	+ -
1-9/100 campi	No. medio/100 campi	+
1-9/10 campi	No. medio/10 campi	+ +
1-9/campo	No. medio/campo	+++
> 9/campo	No maggiore di 9/campo	++++

Tabella 6.3.1. Interpretazione esame microscopico.

L'esame microscopico diretto va quindi fortemente interpretato e valutato nel suo valore diagnostico, così come importante risulta anche la segnalazione di una differente positività della carica microbica espressa in maniera semiquantitativa (+, ++, ++++, ++++) in quanto tale informazione risulta di indubbia utilità in particolare per il monitoraggio della terapia. Quando nel preparato si osservano solo 1-2 bacilli acido-resistenti è buona norma chiedere altri campioni dello stesso paziente (Tabella 6.3.1). Nella refertazione si deve specificare che la positività indica solo che sono stati osservati bacilli

acido-alcol resistenti (BAAR), non necessariamente appartenenti al genere *Mycobacterium* specie tuberculosis. Un ulteriore motivo di confusione diagnostica può essere rappresentato da *Mycobacterium* gordonae reperibile nell'acqua di rubinetto o deionizzata utilizzata in laboratorio (1).

6.4 Terreni di Coltura

Verso la fine del XIX secolo, i primi tentativi di isolamento dei micobatteri su terreni contenenti agar avevano dato risultati poco soddisfacenti. Tuttavia si osservò anche che la presenza nel terreno di coltura di uova intere, farina di patate, glicerolo e sali minerali, solidificati mediante riscaldamento a 85-90 °C per circa 30 minuti era efficace per l'isolamento di *Mycoba cterium tuberculosis*. Successivamente l'aggiunta al terreno di coltura di derivati dei coloranti di anilina tipo il cristalvioletto o il verde malachite risultò favorire la coltura pura dei micobatteri per la eliminazione dei batteri contaminanti il campione biologico.

Molti di questi presupposti teorici sono ancora validi per la produzione dei moderni terreni di coltura per micobatteri.

Attualmente si hanno a disposizione sia terreni solidi che liquidi e quelli comunemente usati nella pratica microbiologica si dividono in selettivi e non selettivi a seconda della presenza o meno di concentrazioni di antibiotico sufficienti ad inibire l'inquinamento da batteri o da funghi.



Figura 8. Terreni Lowenstein-Jensen agarizzati a becco di clarino.

Tra i terreni di coltura solidi non selettivi vanno ricordati il Lowenstein-Jensen (L-J) (Figura 8) e il terreno di Petragnani (ormai di esclusivo valore storico), che hanno incorporato come agente batteriostatico il verde malachite seppure in concentrazioni diverse ed il terreno ATS (American Thoracic Society). Quest'ultimo, usato soprattutto nei paesi anglosassoni, è caratterizzato da una concentrazione molto bassa di batteriostatico per cui viene usato spesso per l'isolamento primario di micobatteri da campioni biologici particolari come il liquido cefalo-rachidiano o il liquido pleurico ove la contaminazione con altri microrganismi è meno probabile.

Nell'ambito dei terreni non selettivi sono compresi i terreni cosiddetti "semisintetici" messi a punto da Cohen e Middlebrook negli anni '50 nei quali vengono solubilizzati in agar sali minerali, composti organici e albumina, destrosio, catalasi, acido oleico cofattori vari, compresa la biotina che permette la crescita di micobatteri danneggiati. Fra questi terreni i più noti sono Middlebrook 7H10 e 7H11 (2) (Figura 9).



Figura 9. Terreno Middlebrook 7H10 agarizzato in piastra Petri.

I terreni agarizzati, costituiti da uno strato sottile e trasparente, consentono una più evidente visione delle colonie nelle prime fasi di crescita, con il vantaggio di una precocità di diagnosi anche se con la tassativa necessità di incubazione in atmosfera arricchita di $\rm CO_2$ 5-10% (Tabella 6.4.1).

Altri terreni non selettivi sono lo IUTM che si differenzia dagli altri per la mancanza di fecola di patate, il Gottsacher e il Coletsos che contengono piruvato e che risultano particolarmente adatti il primo per la coltivazione di *Mycobacterium bovis* ed il secondo come terreno di subsemina per tutti i micobatteri non tubercolari. Tutti questi terreni vengono utilizzati in provetta agarizzati a becco di clarino.

Terreno	Componenti So	stanza batteriostatica:
		verde malachite
Lowenstein-Jensen	Uova intere coagulate, fecola di patate	0,025 g/100 ml
	sali minerali, glicerolo	
Petragnani	Uova intere coagulate, fecola di patate	0,052 g/100 ml
	sali minerali, glicerolo, tuorlo d'uovo,	
	patate intere.	
America Thoracic Society	Tuorli d'uovo fresco coagulati, fecola di	0,02 g/100 ml
Medium	patate, glicerolo.	
Middlebrook 7H10	Sali, vitamine, cofattori, acido oleico	0,0025 g/100 ml
	albumina, catalasi, glicerolo, destrosio	
Middlebrook 7H11	Sali, vitamine, cofattori, acido oleico	0,0025 g/100 ml
	albumina, catalasi, glicerolo, idrolizzato	
	di caseina allo 0,1%	

Tabella 6.4.1. Terreni NON selettivi per l'isolamento dei Micobatteri.

I terreni di coltura selettivi per i micobatteri contengono invece sostanze antibiotiche che inibiscono lo sviluppo della flora microbica contaminante rappresentata da batteri e funghi normalmente presenti nei campioni biologici e che, una volta in coltura, competerebbero con la crescita dei micobatteri.

Questi terreni hanno praticamente la stessa composizione nutrizionale dei terreni non selettivi (ed infatti hanno le stesse denominazioni) ma quello che ovviamente li differenzia è la presenza dell'antibiotico specifico miscelato al terreno, con funzione di inibire la crescita batterica della flora contaminante (Tabella 6.4.2). Talvolta però questi terreni hanno concentrazioni di antibiotico così critiche da poter inibire la crescita degli stessi micobatteri, per cui vengono utilizzati poco nella pratica microbiologica. Si preferisce infatti la semina su terreni non selettivi previa una corretta procedura di decontaminazione e fluidificazione. In alternativa, possono essere usati anche dopo decontaminazione se si presume di essere in presenza di materiali pesantemente contaminati.

I terreni di coltura liquidi rappresentano un medium di crescita molto favorevole per lo sviluppo di *Mycobacterium tuberculosis* e sono in genere utilizzati nei laboratori con intense routine giornaliere di micobatteriologia. Le strumentazioni automatiche garantiscono il monitoraggio continuo della crescita batterica con l'utilizzazione di metodologie di tipo fluorimetrico, colorimetrico o radiometrico. I terreni liquidi, pur essendo più sensibili perché permettono una crescita più rapida e con carica batterica più bassa, in passato non sono stati tenuti in grande considerazione perché presentavano l'incon-

veniente dell'elevata possibilità di contaminazioni. Recentemente, grazie all'impiego di miscele di antibiotici, il problema è stato risolto.

I terreni liquidi di uso più comune sono il brodo di Dubos, addizionato con albumina o siero e il brodo Middlebrook 7H9 che richiede invece l'aggiunta di glicerina e che contiene sali, vitamine, cofattori vari, albumina, catalasi, glicerolo, destrosio e Tween 80. Quest'ultimo è un agente tensioattivo che permette la crescita dispersa dei micobatteri.

Теггепо	Componenti	Sostanze batteriostatiche
Lowenstein-Jensen	Uova intere coagulate, fecola di patate	Verde malachite, 0,025 g/100 ml
	9	
modificato da Gruft	sali minerali, glicerolo, RNA-5 mg/100 m	ml Penicillina, 50 UI/ml
		Acido Nalidixico, 35 mg/ml
Lowenstein-Jensen	Uova intere coagulate,fecola di patate	Verde malachite, 0,025 g/100 ml
modificato	sali minerali, glicerolo,	Cicloesimide, 400 mg/ml
		Lincomicina, 2 mg/ml
		Acido Nalidixico, 35 mg/ml
Middlebrook 7H10	Sali, vitamine, cofattori, acido oleico	Verde malachite 0,0025 g/100ml
modificato	albumina, catalasi, glicerolo, glucosio	Cicloesimide, 360 mg/ml
		Lincomicina, 2 mg/ml
		Acido Nalidixico, 20 mg/ml
Middlebrook 7H11	Sali, vitamine, cofattori, acido oleico	Carbenicillina, 50 mg/100 ml
modificato	albumina, catalasi, glicerolo, idrolizzato	Anfotericina B, 10 mg/ml
(Terreno di	di caseina allo 0,1%	Polimixina B, 200 U/ml
Mitchinson)		Trimethoprim lattato, 20 mg/m

Tabella 6.4.2. Terreni selettivi per l'isolamento dei Micobatteri.

La crescita ottimale delle varie specie di micobatteri è strettamente legata alla temperatura di incubazione. Alcune specie come ad esempio quelle che provocano infezioni della cute (Mycobacterium marinum o Mycobacterium ulcerans o ancora Mycobacterium haemophilum) hanno temperature ottimali di crescita corrispondenti a quella della cute, cioè circa 30°-32 °C. Mycobacterium tuberculosis, invece, cresce in modo ottimale alla temperatura di 35-37 °C; Mycobacterium avium cresce a temperatura di 42 °C e Mycobacterium xenopi a 45 °C.

Anche la velocità di crescita è variabile. Mycobacterium tuberculosis ha tempi di crescita molto lunghi. Sui terreni solidi a base di uova si sviluppa in 25-30 giorni, mentre sui terreni sintetici agarizzati è un po' più precoce, intorno ai 18-20 giorni potendo le colonie essere evidenti talora già dopo 12 giorni di incubazione. I terreni liquidi invece danno tempi di positività medi più ridotti, intorno ai 12-14 giorni anche se con l'inconveniente di non mostrare colonie visibili.

6.5 Esame Colturale

Per quanto riguarda la semina dei terreni si può dire che non esistono regole precise e ogni laboratorio adotta delle procedure consone alla propria esperienza e, soprattutto, ai propri sistemi di identificazione manuali o strumentali.

In genere, è opportuno seminare in parallelo un terreno solido, o a base d'uovo (Lowenstein-Jensen) o sintetico (7H10, 7H11) per la visualizzazione delle colonie, insieme ad un terreno liquido. Ci si può avvalere poi di diversi sistemi di coltura in relazione al tipo di strumentazione presente in laboratorio. Detti sistemi possono essere normali, semiautomatici ed automatici.

Nei terreni solidi a base d'uovo tipo Lowenstein-Jensen si seminano circa 200 μ l di materiale biologico decontaminato e si lascia il tubo inclinato in modo che il liquido copra la superficie del terreno, per circa un giorno, con il tappo lievemente svitato così da favorire l'evaporazione della fase liquida della sospensione stessa e quindi un contatto ottimale dei micobatteri con la superficie del terreno.

Trascorsi uno o due giorni, i tubi vengono quindi rimessi in posizione verticale in termostato a 37 °C per un tempo non inferiore ai 60 giorni nel caso di campioni negativi, in atmosfera possibilmente di $\rm CO_2$ al 5-10% indispensabile se il terreno di crescita è sintetico agarizzato.

La lettura dei campioni incubati viene eseguita a intervalli regolari (5 o 7 giorni) e i risultati della lettura sia positivi che negativi devono essere registrati con un apposito sistema di controllo manuale o informatico. In caso di positività per *Mycobacterium tuberculosis* su terreni a base di patata le colonie inizialmente sono piccole (1-3 mm), secche, friabili, di un tipico color fulvo. Con il passar del tempo diventano di 5-8 mm, rigogliose (crescita eugonica), con un margine piatto ed irregolare ed un aspetto al centro a cavolfiore. Si staccano con facilità dal terreno ma si emulsionano difficilmente (Figura 10).

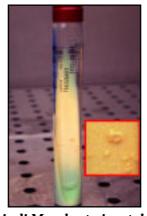


Figura 10. Tipiche colonie di Mycobacterium tuberculosis.

I terreni liquidi sono inoculati in genere con una quantità maggiore di sospensione batterica circa 0,5 ml e la loro incubazione può avvenire a 37 °C in termostati semplici nel caso si usino sistemi manuali cosiddetti bifasici, oppure all'interno di strumentazioni dedicate le quali sono in grado di valutare la eventuale crescita di *Mycobacterium tuberculosis* attraverso la determinazione continua, delle variazioni del consumo di ossigeno o della produzione di CO₂ nello stesso brodo.

Nei laboratori più avanzati vengono utilizzati di routine sistemi colturali quali il sistema MGIT (Becton Dickinson), il sistema bifasico Septi-Chek (Becton Dickinson), il sistema MB REDOX (Biotest). Vi sono poi anche sistemi automatici radiometrici (BACTEC, Becton Dickinson) e non radiometrici quali MB/Bact (Organon Tecnica), BACTEC 9000/F MB (Becton Dickinson), BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson), ESP CULTURE SYSTEM II (AccuMed).

Il sistema MGIT consta di provette contenenti Middlebrook 7H9 a cui si addiziona una miscela di arricchimento (0,5 ml di OADC) ed una di antibiotici (0,1 ml di PANTA). Si inocula 0,5 ml di campione decontaminato e si incuba a 37 °C in posizione verticale. Sul fondo della provetta, all'interno di un film di silicone, è presente un composto fluorescente (complesso metallico di rutenio), sensibile alle variazioni della tensione di O₂, che funge da sistema rivelatore. L'elevato contenuto di O₂ del terreno non inoculato annulla completamente la fluorescenza del complesso metallico. Il metabolismo attivo in caso di crescita micobatterica riduce la tensione di O₂ e conseguentemente si manifesta la fluorescenza. La lettura viene effettuata esponendo la provetta alla lampada di Wood 2 volte settimanalmente per 42 giorni confrontandola sempre con un controllo positivo ed uno negativo. In caso di positività sul fondo della provetta e del menisco del brodo compare un colore arancio brillante. E' necessario poi prelevare una piccola aliquota del brodo dalla provetta che mostra fluorescenza allo scopo di allestire un vetrino. Se all'osservazione si riscontrano solo BAAR, escludendo così la presenza di contaminanti, va eseguita una sottocoltura su terreno solido ovvero si ricorre all'identificazione rapida mediante sonde DNA (2).

Lo stesso principio è poi alla base del sistema Bactec MGIT 960. In questo caso però la fluorescenza è letta automaticamente da un apparecchio (4).

Il sistema bifasico Septi-Chek consta invece di un flacone contenente brodo in cui si inocula 0,5-1 ml di campione decontaminato e concentrato. Questo è in comunicazione con un cilindro in cui vi è un supporto contenente 3 diversi terreni solidi (Middlebrook 7H11, terreno a base di uova, agar cioccolato). Periodicamente il sistema viene capovolto in maniera tale che il brodo vada a bagnare le superfici dei terreni solidi. Gli eventuali micobatteri presenti nell'inoculo si moltiplicano nel brodo e vengono poi trasferiti sui terreni solidi dove daranno colonie ben visibili. Bisogna incubare a 37 °C per

8 settimane. Questo sistema (come tutti i sistemi bifasici) offre il vantaggio della maggiore sensibilità del terreno liquido ed evita l'esecuzione delle sottocolture su terreni solidi selettivi essendo questi già presenti nel sistema stesso. L'agar cioccolato invece evidenzia precocemente le eventuali contaminazioni (2).

Nel sistema MB REDOX è utilizzato invece il terreno liquido Kirchener che contiene sali di tetrazolio. Questi vengono ridotti a formazano dai micobatteri in crescita. Il formazano insolubile, di color rosa-violetto si fissa alle colonie micobatteriche rendendole così facilmente osservabili. Anche in questo caso il periodo di incubazione è di 8 settimane a 37 °C (5).

Il sistema radiometrico BACTEC mette invece in evidenza la produzione di ${\rm CO_2}$. In questo sistema si inocula il campione, opportunamente trattato, in brodo M7H12. Questo ha la stessa composizione del M7H9 ma differisce per la presenza di acido palmitico marcato con $^{14}{\rm C}$. La crescita sarà testimoniata dalla produzione di ${\rm CO_2}$ radiomarcata. Il livello di radioattività è poi rilevato da un beta-counter (Bactec 460 TB). La lettura deve essere effettuata bisettimanalmente per le prime 2 settimane e settimanalmente per le 4 successive. Per quei flaconcini che presentano un Growth Index superiore a 100 (GI>100) è necessario eseguire un vetrino e poi, in caso di positività per BAAR, una sottocoltura su un terreno agarizzato. Questo sistema è molto sensibile ma presenta l'inconveniente della presenza di sostanze radiometriche (6).

Questo aspetto è stato superato con l'introduzione dei sistemi automatici non radiometrici ognuno dei quali serve a monitorare diversi parametri.

Nel sistema MB/BacT vengono utilizzati flaconi contenenti brodo in cui si inocula il campione trattato. Sul fondo della provetta è presente un sensore che vira di colore all'aumentare della concentrazione di ${\rm CO_2}$. Questa variazione è valutata da una cellula fotoelettrica presente nell'incubatore-lettore in cui si alloggiano le provette (7). Questo sistema così come il BACTEC è molto utile per eseguire le emocolture (2).

Nel BACTEC 9000/F MB la crescita è rilevata dalla presenza di fluorescenza che compare in seguito alle variazioni di tensione di O₂ (2).

Con il sistema ESP CULTUR SISTEM II viene invece registrata come indice di crescita batterica la variazione di pressione (2).

Ovviamente le strumentazioni automatiche sollevano gli operatori di laboratorio da numerose operazioni di controllo e monitoraggio della coltura, e hanno indubbi vantaggi di standardizzazione e di catalogazione dei dati con una gestione più ordinata e pressoché priva di errori dei vari campioni. Gli stessi strumenti inoltre sono oggi utilizzati anche per lo studio della sensibilità antibiotica degli stessi ceppi isolati in precedenza, assicurando al clinico o allo pneumologo risposte affidabili in tempi sempre più brevi.

Dopo aver ottenuto colture positive per BAAR la fase successiva prevede l'identificazione.

6.6 Test identificativi

Al fine di identificare Mycobacterium tuberculosis complex il laboratorio può avvalersi oggi di saggi di biologia molecolare sempre più innovativi, di metodologie classiche di tipo biochimico e colturale e di tecniche cromatografiche che permettono uno studio di tipo analitico.

Prove biochimiche

Queste procedure di identificazione dei micobatteri sono ancora oggi utilizzate in pochi laboratori di riferimento mantenendo una loro valenza anche se superati da un punto di vista di studio tassonomico dall'avvento delle metodiche di biologia molecolare. Questi test identificativi sono caratterizzati da una semina dei micobatteri su terreni di coltura resi selettivi dall'aggiunta di particolari sostanze quali NaCl, l'acido tiofen-2-carbossilico, sali biliari (terreno di MacConkey) e in tali condizioni si apprezzano alcune caratteristiche biologiche del batterio quali la velocità di crescita (>7 giorni o <7 giorni), la temperatura di crescita (30 °C, 37 °C, 42 °C), la pigmentazione delle colonie e la presenza di alcune attività enzimatiche quali ureasi, arilsolfatasi, idrolisi del Tween 80, termoinattivazione catalasica, accumulo di niacina.

Già prima di eseguire i test biochimici, la valutazione del tempo di crescita ci permette di dire se siamo nell'ambito dei micobatteri a rapida o a lenta crescita. La semplice osservazione poi della morfologia e pigmentazione delle colonie ci fa valutare se si tratta di un micobatterio scotocromogeno, fotocromogeno o non pigmentato e ci indirizza quindi verso quali prove biochimiche eseguire.

Non appena si osserva la comparsa di colonie è necessario insemenzare due provette di Lowenstein-Jensen con una sospensione della coltura diluita 10⁻²-10⁻³ pari a 0,5 MacFarland al fine di evitare lo sviluppo di una patina; una provetta dovrà essere protetta dalla luce. Entrambe vengono incubate a 35 °C oppure a 32-33 °C (qualora si sospetti un Mycobacterium marinum) fino ad ottenere una crescita visibile nella provetta lasciata scoperta. A questo punto è necessario osservare la presenza o meno di pigmento nel tubo tenuto al buio; se questo è assente, si scherma nuovamente metà della provetta e la si pone ad una distanza di 20-25 cm. da una lampadina accesa da 60 watt per 1 ora. Il tappo della provetta viene allentato durante l'esposizione. Si riapplica l'involucro a tenuta di luce e si incubano di nuovo entrambe le provette per la durata di una notte sempre con i tappi allentati. Si confronta la pigmentazione delle colonie cresciute nelle provette lasciate alla luce, in quelle tenute al buio ed in quelle esposte alla luce per 1 ora. L'assenza di pigmentazione, in entrambe le condizioni, depone per un micobatterio non cromogeno (III gruppo). Se la pigmentazione è comparsa solo dopo l'esposizione alla luce ci troviamo di fronte ad un fotocromogeno (I gruppo); se le colonie sviluppatesi al buio appaiono pigmentate dobbiamo ricercare la specie nell'ambito degli scotocromogeni (II gruppo).

Una breve descrizione di alcuni test che si avvalgono di metodologie biochimiche, specifici soprattutto per la identificazione di *Mycobacterium tuber - culosis*, serve a comprendere in parte la loro complessità e il loro valore in termini di costo-beneficio. Nella tabella 6.6.1 sono riportate le prove biochimiche differenziali tra *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*.

						catal							
	Temp.	Giorn	Niacina	Nitrati	Idrolisi	Semi-	pН	Arilsulfatasi	ureasi	pirazina	T ₂ H	NaCl	Mac
	otti-				tween	quanti-	7.0			midasi			ConKey
	male				80/10	tativa	68°C						
	crescita				giorni								
M.t.	37	12-25	+	+	v	<45	-	-	+	+	+	-	-
M.a.	37	31-42	v	-	-	>45	-	-	v	-	+	-	-
M.b.	37	24-40	v	-	-	<45	-	-	+	-	-	-	-

Tabella 6.6.1. Prove biochimiche differenziali tra Mycobacterium tubercu - losis, Mycobacterium africanum e Mycobacterium bovis.

-Il test alla niacina si esegue sulle colonie in coltura ed è basato sulla incapacità di Mycobacterium tuberculosis di trasformare l'acido nicotinico (niacina) in niacin-ribonucleotide, per cui la prima sostanza si accumula nel terreno di crescita. Positività al test si ha anche per altri micobatteri quali Mycobacterium simiae ed alcuni ceppi di Mycobacterium africanum. Per poter eseguire questa prova le colture devono essersi sviluppate su un terreno all'uovo a becco di clarino; la crescita deve essere stata rigogliosa e per avere risultati sicuri è necessario contare almeno un centinaio di colonie. La ricerca di niacina può essere saggiata aggiungendo poche gocce di acqua o di soluzione fisiologica e lasciando che il liquido di contatto copra il terreno per 15 minuti. E' bene fare dei piccoli tagli sulla superficie del terreno in maniera da favorirne l'estrazione. In seguito 1-2 gocce dell'estratto vengono trasferite in un piattino di porcellana e si aggiungono 2 gocce di anilina al 4% in alcol etilico al 95% e poi CNBr al 10% in soluzione acquosa. La niacina a questo punto interagisce con CNBr e con l'anilina dando un complesso colorato (giallo) (1). Oggi sono utilizzate delle strisce reattive. In questo caso si aggiunge ad ogni coltura 2,5 ml di H₂O distillata sterile. Si lascia il liquido a contatto con le colonie overnight a 37 °C (è bene eseguire sempre dei tagli sul terreno). Il giorno seguente il liquido è estratto e si ripartisce in due provette. Solo in una di essa sarà posta la striscia reattiva mentre l'altra provetta costituirà il bianco. In caso di positività si svilupperà un colore giallo (2) (Figura 11).

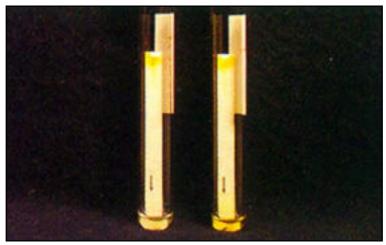


Figura 11. Test della niacina.

-La prova dei nitrati è il successivo test da eseguire. Infatti permette di differenziare *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium kansasii* (positivi alla prova) dai micobatteri del II gruppo di Runyon e da *Mycobacterium avium* costantemente negativi. Risultano invece positivi gli altri del gruppo III. Per la prova è necessaria una coltura su terreno a becco di clarino di 4 settimane. Si preleva un'abbondante ansata e si inocula in una provetta contenente 2 ml brodo nitrato. Si incuba a bagnomaria a 36 °C per 2 ore. Si acidifica con una goccia di HCl diluito 1:2 e si aggiungono 2 gocce di soluzione di sulfanilamide e 2 gocce di -naftilamina. Se i micobatteri saggiati possiedono la nitratoreduttasi avranno ridotto il nitrato e di conseguenza comparirà in un breve arco di tempo un colore rosso vivo. Una eventuale risposta negativa deve trovare conferma dall'aggiunta di un pizzico di polvere da zinco. Infatti lo zinco ridurrà l'eventuale nitrato ancora presente nel brodo e si assisterà alla comparsa del colore rosso (1) (Figura 12).

-L'idrolisi del Tween 80 permette di differenziare colonie di Mycobacterium kansasii e di Mycobacterium tuberculosis positive entro 10 giorni dalle altre negative. Tale prova è di fondamentale importanza per differenziare nell'ambito del III gruppo le specie patogene (Mycobacterium avium) negative, da quelle non patogene positive. La prova saggia la capacità esterasica di alcune specie di idrolizzare il Tween 80. Si aggiungono ad una provetta di 1 ml di H₂O distillata sterile 2 gocce di Tween 80 legato al rosso neutro. Si stempera un'ansata di colonie e si pone in incubazione a 37 °C al buio. Si effettua una prima lettura dopo 5 giorni e quella definitiva dopo 10. L'avvenuta idrolisi è testimoniata dal viraggio al rosso del liquido inizialmente color ambra (2) (Figura 13).

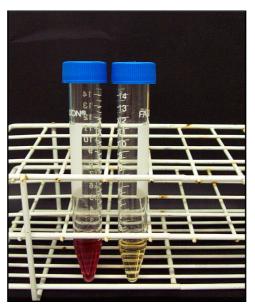


Figura 12. Test di riduzione dei nitrati.

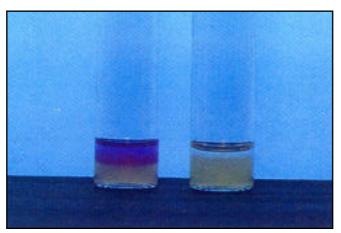


Figura 13. Idrolisi Tween 80.

- Nel valutare la produzione di catalasi si può eseguire l'analisi quantitativa (catalasi semiquantitativa) ed il test di termoinattivazione. Quest'ultimo è basato sulla perdita di attività della produzione della catalasi, da parte di Mycobacterium tuberculosis, quando questi vengono trattati al calore (68 °C per 20 minuti). Anche altri micobatteri atipici danno positiva questa prova come ad esempio Mycobacterium bovis o Mycobacterium gastri. L'analisi quan-

titativa della produzione catalasica consiste invece nel misurare l'altezza della colonna di bollicine di gas che si sviluppa dopo aver aggiunto 1 ml di miscela Tween $80\text{-H}_2\mathrm{O}_2$ a colonie in fase attiva di crescita. Per questa prova è necessario l'utilizzazione di tubi di Lowenstein-Jensen speciali non a becco di clarino (20x150mm). Mycobacterium tuberculosis sviluppa un'altezza inferiore a <math>45 mm (1) (Figura 14).

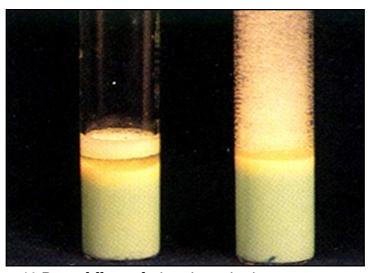


Figura 14. Prova della catalasi semiquantitativa.

-La prova della pirazinamidasi valuta la deaminazione nell'arco di 4 giorni della pirazinamide ad acido pirazinoico. La prova permette di distinguere i ceppi di Mycobacterium bovis debolmente produttori di niacina, negativi alla prova, dai ceppi di Mycobacterium tuberculosis sempre positivi. Anche Mycobacterium marinum e Mycobacterium avium risultano essere positivi (8, 9).

-Una prova utile per differenziare Mycobacterium tuberculosis da Mycobacterium bovis è l'inibizione della crescita di Mycobacterium bovis da parte dell'idrazide dell'acido tiofen-2-carbossilico (T₂H). Questo test è estremamente importante in quanto il 30% dei ceppi di Mycobacterium bovis BCG possono accumulare piccole quantità di niacina e possono dare una reazione debolmente positiva alla riduzione dei nitrati (8, 9).

-Il NAP (para-n-alfa-acetilazione beta-idrossi-propriofenone) test rappresenta un test biochimico nel quale la sostanza NAP contenuta in un flacone di brodo 7H12 è in grado di inibire in modo selettivo la crescita di Mycobacterium tuberculosis complex quando questo è presente nel campione inoculato, mentre non inibisce la crescita dei batteri non tubercolari (MOTT). Questo è un test di differenziazione che utilizza il sistema radiometrico (Bactec 460-BD) (2).

Tecniche cromatografiche

Le più conosciute ed eseguite nell'ambito della microbiologia sono quelle della GLC (gas-liquido cromatografia) ed HPLC (cromatografia liquida ad elevata selettività).

Queste tecniche permettono di identificare i batteri previa analisi degli acidi grassi presenti nella parete cellulare. E' quindi una identificazione di tipo analitico il cui principio è la distribuzione degli analiti in due fasi (mobile e stazionaria). Questi fluiscono nella fase mobile e passano con essa nella fase stazionaria dove in base alla loro maggiore o minore affinità per quest'ultima si separano, dando origine così al cromatogramma.

Nella gas-cromatografia la fase mobile è rappresentata da un gas mentre la fase stazionaria può essere un liquido a bassa tensione di vapore, adsorbito su materiale inerte poroso (gas-liquido cromatografia) o solida (gas-solido cromatografia).

Per le identificazioni microbiologiche è stato messo a punto un sistema automatico di identificazione, il MIS (Microbial Identification System), che permette l'identificazione automatica, nel nostro caso di un micobatterio, confrontando il profilo degli esteri degli acidi grassi metilati della sua parete con quelli di micobatteri già noti e contenuti in una libreria di cui il MIS è in possesso.

Il sistema prevede l'utilizzazione di un gas-cromatografo, Hewlett-Packard serie 6890, in cui l'azoto, prodotto da un generatore, funge da gas carrier e passa in una colonna di tipo capillare, dove è alloggiata la fase stazionaria liquida (Figura 15).

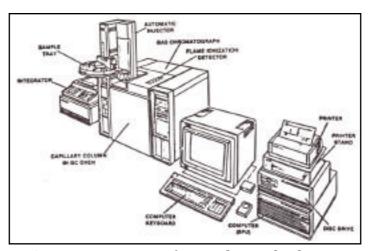


Figura 15. Sistema gascromatografico Hewlett-Packard serie 6890.

Lo strumento consta di un iniettore che permette l'introduzione del campione, un forno in cui è alloggiata la colonna, un rivelatore e una stazione dati (ChemStation) completata poi da una stampante.

Durante la corsa gas cromatografica devono essere raggiunte temperature tali da far evaporare tutti i componenti del campione (esteri degli acidi grassi metilati) che, passati allo stato gassoso, possono fluire, insieme all'azoto, lungo la fase stazionaria. Il rivelatore brucia gli atomi di carbonio contenuti negli esteri degli acidi grassi e questo segnale chimico trasformato in segnale elettrico dal rivelatore, è inviato ad un amplificatore e successivamente alla stazione dati che elabora e confronta. I diversi componenti usciranno dalla colonna in tempi diversi (tempo di ritenzione) a seconda della loro diversa affinità per la fase stazionaria. La stampante fornirà il cromatogramma in cui ad ogni picco corrisponderà un diverso acido grasso. La linea base del cromatogramma rappresenta il flusso del gas carrier, la cui intensità risulta sempre costante (Figure 16).

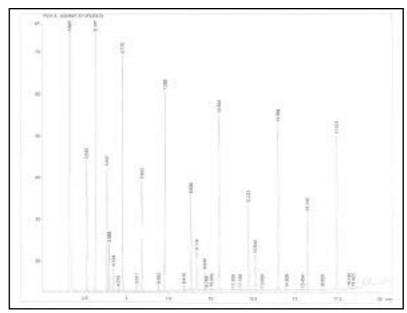


Figura 16. Profilo gascromatografico dello standard.

I micobatteri, come del resto tutte le cellule batteriche modificano la composizione quantitativa e qualitativa degli acidi grassi a seconda delle condizioni ambientali per cui è necessario standardizzare le condizioni di crescita.

Per la coltura deve essere utilizzato il Middlebrook 7H10 addizionato di OADC; si semina secondo la tecnica dei quattro quadranti.

L'incubazione prevede necessariamente un'atmosfera di ${\rm CO_2}$ al 5-10% per un tempo diverso a seconda della specie.

Quando si è ottenuta una buona crescita si passa alla fase della preparazione degli estratti che prevede 5 tappe: raccolta della patina, saponificazione, metilazione, estrazione, lavaggio (Figura 17).

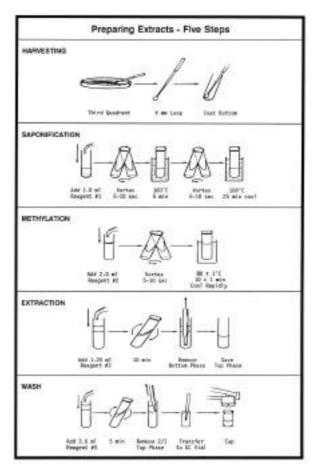


Figura 17. Fasi procedurali per estrazione e metilazione degli acidi grassi. (Traububg Manual, MIDI, Inc., R: Paisley ed., 1999).

La patina deve essere raccolta dal 3° quadrante, dove si ottiene di solito una cospicua crescita con colonie ben separate. Si deve utilizzare un'ansa di 4 mm e provette in vetro con tappi di teflon.

Durante la tappa successiva (saponificazione) si deve ottenere la lisi delle cellule per liberare gli acidi grassi dai lipidi cellulari per cui si addiziona alla patina raccolta $1.0~\mathrm{ml}$ di R_1 (NaOH in metanolo acquoso).



Per facilitare questa operazione si aggiungono bigliette di vetro. Si vortexa per 5-10 secondi; si pone la provetta in $\rm H_2O$ a 100 °C per 25 minuti. Segue la metilazione in cui si aggiungono 2.0 ml di $\rm R_2$ (HCl con metanolo) si vortexa per 5-10 secondi e si sistema la provetta in un bagnomaria a 80°±1 °C per 10 ±1 minuti.

Al termine di questa fase gli acidi grassi saranno metilati e dovranno essere estratti (III fase) aggiungendo 1,25 ml di R₃ costituito da HEXANE e MTBE (Methyl-tert Butyl ether). E' necessario poi miscelare per inversione per 10 minuti al termine dei quali è rimossa la fase acquosa sottostante.

Si esegue un lavaggio della fase organica (IV fase) utilizzando l' R_4 (NaOH con H_2 O distillata). Nei 5 minuti successivi si rimiscela in maniera da separare bene la fase contenente gli esteri degli acidi grassi estratti. Per ottenere una migliore separazione è consigliata anche una successiva centrifugazione a 2000 x g. al termine della quale si prelevano poi i 2/3 superiori degli estratti e si trasferiscono nella provettina per la gas cromatografia. Questa va chiusa ermeticamente e può essere conservata per diversi giorni a +4 °C (10, 11, 12).

L'HPLC è un tipo di cromatografia in cui la fase mobile, un liquido ad alta pressione, passa nella fase stazionaria. Prevede ugualmente una saponificazione e una estrazione degli acidi micolici e un loro successivo trattamento chimico (derivatizzazione) (Figura 18).

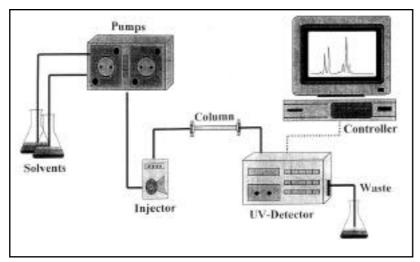


Figura 18. Schema a blocchi dell'HPLC (Butler et al. Clin. Microbiol. Rev. 14: 704-726, 2001).

Si ottiene così un profilo cromatografico che può essere confrontato con

standard specifici di riferimento. Con questa tecnica riusciamo ad identificare acidi grassi contenenti fino a 26 atomi di carbonio, mentre con la gas cromatografia ci fermiamo a 20-22 atomi (13, 14, 15).

Queste tecnologie sono presenti soprattutto nei laboratori di riferimento regionali o nazionali, in quanto richiedono personale esperto sia sulla pratica metodologica che nella interpretazione dei pattern molecolari, per cui rappresentano il livello più fine della diagnostica tubercolare al quale giungere quando le altre tecnologie si sono mostrate insufficienti.

Tecniche di biologia molecolare

I metodi convenzionali di laboratorio per l'isolamento, l'identificazione e la tipizzazione spesso si dimostrano inadeguati al compito. La crescente comprensione della biologia molecolare dei micobatteri, legata a procedure di isolamento di acidi nucleici sempre più sensibili, ha portato all'allestimento di nuovi metodi (16).

Queste metodologie di studio sono nel complesso piuttosto recenti. La prima amplificazione di micobatteri fu infatti eseguita da A. Hance nel 1989.

Fra le varie tecniche utilizzate in biologia molecolare per la diagnostica di *Mycobacterium tuberculosis*, quelle maggiormente usate nei laboratori di microbiologia sono soprattutto l'utilizzazione di sonde geniche (DNA probes), PCR (Polymerase Chain Reaction), TMA (Transcription Mediated Amplification), SDA (Strand Displacement Amplification).

Fondamentalmente tali tecniche possono essere utilizzate per l'identificazione di Mycobacterium tuberculosis complex da cultura e da campione.

Per molti anni queste metodiche a causa della complessità sono state appannaggio solo dei laboratori di ricerca. Oggi, grazie alla standardizzazione delle varie fasi operative ed all'utilizzazione di strumentazioni automatiche, esse sono largamente utilizzate anche dai laboratori di routine con ottimi risultati.

I DNA probes o sonde oligonucleotidiche sono delle piccole catene oligonucleotidiche in grado di riconoscere in modo molto selettivo alcune sequenze nucleotidiche complementari specie-specifiche presenti sulla catena del DNA nucleare denaturato o del RNAribosomiale del *Mycobacterium tubercu losis.* Qualora nel materiale genetico è presente la sequenza complementare alla sonda avviene la ibridizzazione.

Le sonde sono marcate con molecole chemioluminescenti che, una volta eccitate, emettono radiazioni luminose rilevabili con un luminometro. A seconda della quantità di luce rilevata l'apparecchio fornisce direttamente il risultato positivo o negativo. In caso di positività l'identificazione corrisponde al probe impiegato e l'osservazione delle colonie permette di limitare il saggio solo al probe più probabile.

Oltre che per Mycobacterium tuberculosis sono a disposizione DNAprobes

anche per Mycobacterium avium-intracellulare, Mycobacterium gordonae, Mycobacterium kansasii (AccuProbe; Gen-Probe). E' consigliabile l'utilizzazione delle sonde anche per l'identificazione di micobatteri isolati da terreni liquidi (BACTEC 12B, ESP-Myco Bottles) (17, 18).

Se si parte da colture su terreno solido è necessario prelevare una piccola parte di patina e sospenderla in una provetta contenente $100~\mu l$ di tampone e $100~\mu l$ di soluzione lisante. Si vortexa avvalendosi dell'ausilio di bigliette di vetro e poi si sonica per 15 minuti in modo da ottenere la lisi delle cellule; si incuba per 10 minuti a 95 °C. Al termine di questa fase si è ottenuta l'inattivazione del DNA.

Successivamente si trasferiscono 100 μ l di lisato in una provetta contenente la sonda e si incuba per 15 minuti a 60 °C (2).

La provetta è poi tenuta per 5 minuti a temperatura ambiente. Si effettua poi la lettura.

Se si devono identificare micobatteri cresciuti in terreni liquidi è necessario prima centrifugare (3000-10000 g x per 15 -20 minuti) un'aliquota del terreno in questione (1-1,5 ml). Si procede poi come per le colture da terreno solido (17, 18).

Le sonde comunque hanno una bassa sensibilità. Infatti il limite della rivelazione è dell'ordine di 10^7 batteri, mentre il numero di bacilli in molti campioni risulta essere molto più basso di questo valore (19). Le sonde geniche come tali quindi non sono sufficientemente sensibili per la rivelazione diretta dei micobatteri nei campioni clinici. Per questo si sono affermate come metodo di elezione per l'identificazione a livello di specie di micobatteri solo dopo isolamento e crescita in coltura. Inoltre le sequenze bersaglio per queste sonde sono spesso corte e l'intervento di una mutazione o di una naturale variazione può portare a fallimento nell'identificazione del microrganismo (20).

La PCR (Reazione di Polimerizzazione a Catena) è una tecnica in vitro, scoperta da Kary B. Mullis nel 1983, grazie alla quale un frammento di DNA (o RNA) specifico per il microrganismo che si intende ricercare e di cui si conosce la sequenza nucleotidica terminale, viene amplificata in maniera esponenziale. In questo modo si ottengono in tempi molto brevi alcuni microgrammi di DNA a partire da un numero molto ridotto di molecole iniziali (in casi estremi anche da una sola molecola). Fungono da innesco per la reazione due primers la cui sequenza è complementare alle regioni che delimitano la sequenza specifica e che sono contenuti nella miscela di reazione insieme ad un eccesso di desossiribonucleotidi (dNTPs).

Il DNA che funge da stampo viene denaturato al calore (94 °C). Successivamente la temperatura viene abbassata in modo da favorire l'ibridazione del DNAbersaglio monoelica con il primer complementare; infine la temperatura viene portata a 72 °C per consentire ad una DNA polimerasi

resistente al calore di sintetizzare il filamento complementare in direzione 5'-3' a partire dai primers utilizzando i dNTPs contenuti nella miscela di reazione. Questi tre cicli (denaturazione, ibridazione, polimerizzazione) vengono ripetuti 30-40 volte e così si ha la sintesi esponenziale del primo frammento di DNA (21).

Nel caso specifico di *Mycobacterium tuberculosis*, i primers utilizzati, pur nella variabilità delle metodiche, sono specifici per particolari sequenze di inserzione. Le più note sono la IS6110 ed il gene che codifica per la proteina 65KD (2).

L'utilizzazione della PCR in micobatteriologia offre degli indubbi vantaggi:

- alta sensibilità per cui questa tecnica potrebbe svelare anche una sola molecola di DNAo RNA.
 - brevi tempi di risposta (alcune ore);
 - campione di qualsiasi natura ;
 - piccole quantità di materiale.

Vi sono comunque aspetti negativi da tenere in debita considerazione quali il riscontro di un elevato numero di falsi positivi e l'alta percentuale di contaminazioni.

Quello di una probabile contaminazione (carry-over) in una seduta di PCR è un'evenienza che deve sempre essere tenuta presente per cui è necessario prendere degli accorgimenti adeguati. Fonti di inquinamento sono rappresentate prevalentemente dai prodotti di amplificazione di precedenti sedute che possono fuoriuscire dalla provetta sotto forma di aerosol ogni volta che la provetta viene aperta. Altre importanti fonti di contaminazione sono l'ambiente e gli strumenti con cui si preparano i campioni di DNAcontenenti la regione da amplificare. Allo scopo di evitare la contaminazione è necessario disporre di differenti aree di lavoro. E' fondamentale tenere separati i prodotti dell'amplificato da tutti i reagenti. Il flusso di lavoro deve avvenire in una sola direzione, vale a dire: Area 1_ Area 2_ Area 3. Nell'Area 1 si preparano i reagenti; nell'Area 2 si preparano invece i campioni ed infine nell'Area 3 si amplifica e si rivela (21).

Nel tentativo di limitare il fenomeno delle contaminazioni alcuni kit commerciali (AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis, Roche) prevedono l'utilizzazione del sistema AmpErase che contiene l'enzima uracile-N-glicosilasi. Questo catalizza la reazione di distruzione del DNA contenente desossiuridina. La desossiuridina non è presente nel DNA naturale e si ritrova solo nel DNA amplificato al posto della timidina. L'impiego dell'AmpErase sul campione, prima dell'inizio della reazione di amplificazione, elimina quindi eventuali contaminazioni di sedute precedenti (22).

Le difficoltà all'impiego della PCR nella routine di laboratorio, legata soprattutto alla necessità di strutture ed attrezzature dedicate per evitare gli inquinamenti hanno spinto a cercare strade alternative. Infatti la Gen-Probe ha messo a punto di recente un nuovissimo sistema di rilevamento diretto chiamato Transcriptation Mediated Amplification (TMA) per Mycobacterium tuberculosis complex nell'escreato.

Il sistema TMA prevede tre fasi: preparazione del campione, amplificazione, rivelazione (Figura 19).

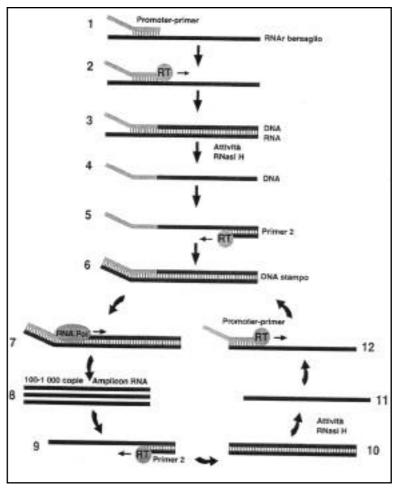


Figura 19. Schema di amplificazione TMA (Tortoli E. Micobatteriologia. Quaderni di microbiologia clinica. 1999).

Nella prima fase bisogna ottenere la lisi del microrganismo per liberare l'acido nucleico bersaglio. Le provette, contenenti il campione opportunamente trattato e concentrato ed il tampone di lisi, vengono quindi tenute ad una temperatura di 95 $^{\circ}$ C per breve tempo.

Nell'amplificazione vengono utilizzati due enzimi, RNA Polimerasi e Trascriptasi inversa (DNA polimerasi RNA-dipendente) e due primer. Uno dei due primer contiene una sequenza che determina l'avvio dell'attività della polimerasi stessa (sequenza promoter dell'RNA polimerasi). Durante la prima fase della amplificazione il promoter-primer si ibrida con l'RNAr bersaglio su un sito ben definito e la trascriptasi inversa sintetizza una copia di DNA dell'RNAr bersaglio, a partire dalla sua estremità 3'. L'RNAdell'ibrido RNA/DNA così sintetizzato viene successivamente degradato tramite l'attività RNAsica della stessa trascriptasi inversa. Un secondo primer si fissa quindi alla copia di DNA. Una nuova catena di DNAviene sintetizzata dalla trascriptasi inversa a partire dalla estremità del primer, creando così un DNA a doppia elica. L'RNA polimerasi riconosce la sequenza del promoter del DNA stampo sulla doppia elica del DNA ed inizia la trascrizione di nuove molecole di RNA. Ogni nuovo RNA entra a sua volta nel ciclo di amplificazione e servirà da stampo per un nuovo ciclo di replicazione, permettendo così una riproduzione esponenziale dell'RNA.

Al termine della metodica di amplificazione l'RNAamplificato viene rivelato mediante il legame con sonde di DNA specifiche marcate con esteri di acridinio, le quali sono in grado di legarsi specificamente con l'RNA bersaglio nella regione 16S. L'ibrido che si forma emette chemiluminescenza e può quindi essere rilevato con facilità misurando l'assorbanza con un comune luminometro (23).

La cinetica del TMAè molto rapida. Dieci miliardi di RNAamplicon vengono prodotti in meno di un'ora, partendo da una sola molecola bersaglio. Il metodo TMAè applicabile a tutti i tipi di acidi nucleici, quali RNAr, RNAm, DNA.

In questa metodica manca la fase di denaturazione del DNA, che come è noto avviene ad alta temperatura (90-95 °C), per cui l'intero processo può avvenire a temperatura costante e può essere realizzato in un incubatore o in bagno-maria. Quindi non è più necessario l'uso di un thermal cycler, del resto molto costoso. Inoltre le reazioni avvengono tutte nella stessa provetta e questo elimina il problema dei facili inquinamenti.

Bisogna considerare infine che la molecola dell'RNA dei micobatteri, al contrario del DNA, è molto instabile se estratta da batteri morti o non vitali. Per questo il test TMA appare molto più affidabile rispetto alla PCR nel monitorare la risposta dei pazienti alla terapia. Infatti in questi soggetti, nonostante la guarigione clinica, è possibile riscontrare DNA di micobatteri non vitali. La PCR amplifica questo DNAdando così dei falsi risultati positivi. Questo non accade con la metodica del TMA, in quanto l'RNAmolto più labile, sopravvive molto poco alla morte cellulare (23, 24).

E' da ricordare che laddove i metodi "home made" sono ampiamente diffusi ma difficilmente standardizzabili, le metodiche commerciali sono invece standardizzate. Il test commerciale, Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (AMTD), permette l'amplificazione qualitativa dell'rRNAdel Mycobacterium tuberculosis complex direttamente dai campioni clinici. Questi devono essere prima decontaminati e concentrati. E' necessaria l'accurata disinfezione dei banchi di lavoro e della strumentazione con soluzione di ipoclorito allo scopo di distruggere eventuali residui di RNA.

Devono essere considerati positivi i campioni i cui valori di RLU (Relative Light Unit) sono superiori a 30000. I campioni che presentano valori inferiori devono essere considerati negativi. E' necessario ritestare campioni per i quali otteniamo valori superiori a 500000. Come per ogni procedura, è bene sempre inserire dei controlli positivi e negativi (non inseriti nel kit). I campioni concentrati e decontaminati possono essere conservati a -20 °C o a -80 °C anche per mesi avendo l'accortezza di non scongelarli e ricongelarli ripetute volte. E' possibile interrompere la procedura dopo la fase di amplificazione conservando l'amplificato overnight a -20 °C (2).

L'SDA(Strand Displacement Amplification) è una metodica isotermica di amplificazione del DNA in vitro. In questa tecnica ci si avvale dell'azione combinata di una DNA polimerasi e dell'enzima di restrizione HincII. Questo ha la capacità di tagliere il DNA in un punto ben preciso. La metodica permette una rapida identificazione del Mycobacterium tuberculosis complex e delle altre specie micobatteriche. Nel primo caso il frammento di DNAche funge da target è la sequenza IS6110. Per le altre specie è invece 16S rRNA. Nella prima fase, che prevede la produzione del target, due primer complementari di sequenze bersaglio molto vicine, si legano ad un filamento di DNA denaturato. Il primer a valle contiene il sito di restrizione. Grazie alla DNA polimerasi i due primer si allungano e quello a monte spiazza quello a valle. I filamenti spiazzati si uniscono ad altri primer dando luogo ad ulteriore allungamento-spiazzamento. Segue la fase di amplificazione esponenziale in cui i filamenti dei dimeri contenente il sito di restrizione vengono tagliati in due frammenti da uno specifico enzima e la porzione a monte si allunga spiazzando quella a valle. Il frammento spiazzato funge da stampo per il primer a valle e contemporaneamente si allunga ricreando il sito di restrizione. In ogni seduta viene co-amplificato anche un controllo interno avente sequenza di annealing identica a quella del target. E' inoltre prevista l'utilizzazione dell'Uracil N-Glycosilase per eliminare le eventuali contaminazioni di precedenti sedute. Con questa tecnica si amplificano fino a 10⁹ copie in un arco di tempo di 2 ore. La sensibilità del metodo è di 50 CFU per campione. Dopo questa fase si rileva l'amplificato in tempo reale grazie all'utilizzazione di sonde marcate con ³²P che ibridizzano con i primers. La reazione chemiluminescente è misurata poi da un luminometro. In commercio è disponibile il kit BDProbe Tec-SDA system (Becton Dickinson Diagnostic System) (25, 26). Questo prevede la decontaminazione dei campioni con NALC-NaOH, la denaturazione del DNA al calore, l'amplificazione con metodica SDA ed infine la rilevazione. Occorrono circa 250 µl di campione trattato. Questo viene posto in una provetta contenente 1.0 ml di diluente del campione. Si centrifuga a 12,200 x g per 3 minuti. Il sopranatante è decantato. Si aggiungono capsule contenenti zirconio e silice con lo scopo di rompere meccanicamente la parete dei micobatteri. Quindi si vortexa per 5 secondi ed il tubo è posto in Lysolyzer (Becton Dickinson) ed incubato a 105 °C per 1 ora. La provetta è poi agitata per circa 45 secondi ed infine il preparato è sottoposto ad amplificazione, ibridazione e rilevazione dallo strumento automatico fornito dalla Becton Dickinson (26).

Indagini sierogiche

Per una prima indagine in tal senso bisogna risalire al 1898 quando si allestì un test di agglutinazione con micobatteri uccisi. Nel 1948 fu poi messa a punto la reazione di emoagglutinazione di Middlebrook-Dubos. Oggi, grazie all'applicazione della tecnica ELISA, si sono potute effettuare vaste ricerche con diversi antigeni micobatterici (27).

Tuttavia la diagnosi di tubercolosi è ancora poco affidata alle indagini sierologiche a causa della bassa specificità in quanto i micobatteri hanno numerosi antigeni in comune con i generi Bacillus, Corynebacterium, Nocardia. La stessa comunanza antigenica è stata riscontrata anche nei confronti di Leishmania e dell'antigene umano HSP 65.

Per ovviare a questi problemi si tenta di mettere a punto test sierologici comprendenti pannelli di antigeni immunodominanti (sintetici o naturali) con i quali si ottiene una specificità vicina al 100% ed una sensibilità del 30-50% (ancora però molto bassa). Questo risultato si potrebbe spiegare con il fatto ormai noto che circa un 20% di pazienti tubercolotici non produce alcun tipo di anticorpo. Si è pensato che questi soggetti producano sostanze immunodepressive, oppure che vi siano antigeni circolanti che formano immunocomplessi con gli anticorpi circolanti. Di conseguenza questi ultimi sarebbero mascherati, indisponibili per una reazione in vitro.

Nei soggetti con buona risposta cellulo-mediata, per i quali la prognosi è favorevole, non è possibile dimostrare anticorpi nel siero. La migliore risposta diagnostica si ha dopo tre mesi di malattia ed è per questo che è sempre bene ripetere il test a distanza di tempo (2).

False positività si riscontrano invece in soggetti guariti da tempo od in contatto con individui ammalati.

La diagnostica sierologica si sta rivelando molto utile nelle forme pediatriche, nelle forme paucibacillari, nei malati di AIDS, nel monitoraggio dei pazienti in terapia, nelle forme extra-polmonari. In particolare nei soggetti HIV-positivi il titolo anticorpale si eleva in maniera significativa alcuni mesi prima del manifestarsi del quadro clinico (27).

Le prime preparazioni antigeniche erano rappresentate da bacilli tubercolari uccisi, successivamente furono utilizzati estratti bacillari globali, la stessa tubercolina ed il PPD. Oggi in commercio vi sono kit in cui vengono saggiati antigeni proteici, polisaccaridici, glicoproteici. Possono essere di provenienza citoplasmatica o essere stati estratti dalla parete batterica (lipoarabinomannano, arabinogalattano) (27).

Uno dei kit più utilizzati in laboratorio è quello che saggia l'Ag60 (TB-test, Eurospital). Questo è una glicoproteina, principale componente della tubercolina di riferimento RT-23. In realtà si tratta di una miscela di antigeni. Il test risulta essere altamente sensibile, ma poco specifico per *Mycobacterium tuber culosis*. Infatti è reattivo con l'intero genere *Mycobacterium*. Ha inoltre comunanza antigenica con i generi *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Legionella*, con il protozoo *Leishmania*. Ma sono state riscontrate false positività anche nei pazienti affetti da sarcoidosi, neoplasie, fibrosi cistica, infezione da *Treponema palli dum* e infestazione da Echinococco.

La tecnica utilizzata è l'ELISA. Il siero deve essere diluito 1:100 ed incubato a 37 °C. Sono forniti 3 Kit diversi per saggiare rispettivamente le IgG, IgA ed IgM (2).

Pathozime TB complex Plus (Biogenetics) saggia invece gli anticorpi contro gli antigeni 38 kDa ed il 16 kDa, entrambi proteici e specifici per *Mycoba* - cterium tuberculosis complex. Il siero impiegato è diluito 1:50 ed incubato a 37°C. La positività si determina in seguito a lettura ottica e confronto con un siero debolmente positivo fornito dal kit.

L'antigene 38 kDa è testato insieme al lipoarabinomannano con l'utilizzazione del kit Pathozyme Myco IgG (Biogenetics). Il siero è diluito 1:100 ed anche in questo caso vengono valutate le tre classi principali di immunoglobuline (2).

Il lipoarabinomannano (LAM) è testato grazie alla tecnica di immunoblotting (Mycodot, AlfaBiotec). E' un test molto rapido e semplice da eseguire sia su sangue intero eparinato che su siero. La diluizione in questo caso è di 1:20. Il kit fornisce una micropiastra con 8 pozzetti in cui si devono alloggiare i sieri in esame ed i controlli (positivo e negativo). Inoltre fornisce un pettine di plastica con otto denti all'estremità dei quali vi è l'antigene. I pettini vengono poi posti nei pozzetti. L'avvenuta reazione tra antigene adeso al dente del pettine e l'eventuale anticorpo presente nel siero saggiato è rivelato dalla comparsa di una macchia di colore all'apice del dente. Si valuta la positività dal confronto con le gradazioni di colore presenti su di un cartoncino (28).

I risultati hanno evidenziato che la sensibilità del test in soggetti con tubercolosi acuta sia con localizzazione polmonare che extrapolmonare varia dal 40% al 70% (29). Recentemente è stato commercializzato un nuovo test, il Detect-TB (BioChem-ImmunoSystems) che saggia 5 peptidi sintetici e proteine ricombinanti. E' un test ELISA in cui si utilizza siero diluito 1:20 (2).

La cinetica di comparsa delle immunoglobuline, pur rispettando nelle linee generali quella delle altre malattie infettive, se ne discosta alquanto per le complesse interazioni esistenti tra immunità umorale e cellulo-mediata. Le IgM sono le prime che compaiono, permangono in circolo per 6-9 mesi. Sono scarsamente rilevabili nel caso delle forme post-primarie e di quelle extrapolmonari. Il loro graduale decremento corrisponde all'aumento delle IgG. L'ipotesi di una infezione attiva o recente è confermata dalla contemporanea presenza di IgM, IgG ed IgA. La positività alle IgG è notevole nelle infezioni post-primarie. Inoltre si assiste alla negativizzazione del titolo in caso di una buona risposta alla terapia e guarigione clinica. Queste Ig sono presenti (contrariamente alle IgM) anche nei soggetti tubercolino positivi (2).

Le IgA invece sembrano rilevabili intorno al 50% dei casi di tubercolosi attiva. Inoltre nel 25% dei casi si riscontrano titoli elevati anche dopo la guarigione clinica per cui dovrebbero avere scarsa importanza per valutare casi di tubercolosi in fase attiva. Nelle forme extra-polmonari la risposta immune gioca un ruolo diverso a seconda delle sedi. Infatti si riscontrano alti titoli di IgG ed IgA nelle forme di osteomielite. Lo stesso non ha trovato riscontro nelle forme pleuriche e meningee (2).

6.7 Studio della sensibilità antibiotica

Lo studio della sensibilità antibiotica di Mycobacterium tuberculosis rappresenta una fase molto importante nella diagnostica della tubercolosi, fondamentale per il corretto approccio terapeutico e per la verifica di eventuali ceppi resistenti o multiresistenti (DR-TB o MDR-TB).

L'esecuzione del saggio della sensibilità si può eseguire o in modo indiretto su colonie sviluppate in coltura o in brodo o diretto su materiale patologico nel quale sia stata però preventivamente accertata la presenza dei bacilli tubercolari. In entrambi i casi il saggio viene eseguito con il metodo delle proporzioni critiche proposto da Canetti e collaboratori nel 1963 (30). Questo è basato sull'osservazione empirica secondo la quale se più dell'1% della popolazione di micobatteri mostra resistenza "in vitro" ad un determinato antibiotico, tale antibiotico sarà considerato resistente "in vivo". Infatti è stato visto che tale percentuale è destinata ad aumentare rapidamente per effetto della terapia. Questo presuppone quindi la conoscenza di concentrazioni critiche di ciascun antibiotico all'interno del terreno di coltura come valore limite per verificare la eventuale crescita dell'1% della popolazione dei micobatteri (Tabella 6.7.1).

Nel metodo delle proporzioni critiche il saggio di sensibilità si può effettuare su diversi tipi di terreni di coltura sia solidi (Lowenstein-Jensen, 7H10, 7H11) nonché su terreni liquidi avvalendosi di varie metodologie di controllo della crescita.

Antibiotico	Lowenstein-Jensen	Middlebrook7H10	Middlebrook 7H11
Isoniazide	0,2	0,2	0,2
Rifampicina	40	1,0	1,0
Streptomicina	a 4,0	2,0	2,0
Etambutolo	0,2	2,0	10,0
Pirazinamide	25	-	-
Ciprofloxacin	ia -	1,0	1,0

Tabella 6.7.1. Concentrazioni critiche di antibiotico ($\mu g/ml$) per il saggio di sensibilità.

Il principio operativo sul quale si basa il metodo delle proporzioni è quello di eseguire un inoculo standard di bacilli su un terreno antibiotato (liquido o solido) e di inoculare contemporaneamente un tubo dello stesso terreno non antibiotato. Quindi dopo i necessari periodi di incubazione si verifica la crescita sui due tipi di terreno antibiotato e non antibiotato, e si valuta con una semplice formula matematica la percentuale di crescita del tubo antibiotato.

% di Resistenza =
$$\frac{N^{\circ} \text{ colonie terreno antibiotato}}{N^{\circ} \text{ colonie terreno di controllo}} x 100$$

La percentuale di resistenza è calcolata quindi come numero di colonie presenti sul terreno antibiotato rispetto alle colonie cresciute sul terreno di controllo. Se questo valore sarà superiore a 1%, il farmaco non sarà utilizzato dal clinico nella terapia.

Nei terreni liquidi non è possibile calcolare in questo modo la percentuale di crescita delle colonie in quanto nei brodi non è possibile apprezzare la crescita batterica non formandosi colonie. Ci si avvale quindi di strumentazioni completamente automatiche (Bactec 460, MGIT 960) o semiautomatiche (lettori fluorimetrici) in grado di interpretare i segnali di crescita.

Queste ultime metodiche sono quelle oggi maggiormente utilizzate nei laboratori di micobatteriologia.

Nell'allestimento dei saggi di sensibilità agli antibiotici per *Mycobacterium* tuberculosis complex è stato necessario affrontare una serie di problematiche legate alle caratteristiche biologiche del microrganismo in causa. Infatti i micobatteri presentano resistenza casuale a farmaci indipendentemente dall'esposizione stessa al farmaco (31). E' stato stimato che in una popolazione di 10⁵ micobatteri vi sarà un batterio resistente all'Isoniazide, mentre in una

popolazione di 10^6 ve ne sarà uno resistente alla Streptomicina. Se questi due farmaci dovessero essere somministrati contemporaneamente, la frequenza dei mutanti diventerebbe 10^{11} . Tenendo conto che in una cavità polmonare aperta la popolazione batterica ammonta a 10^7 - 10^9 , risulta necessario trattare i pazienti con l'associazione di più farmaci a cui il ceppo è risultato sensibile (8).

Per l'esecuzione dell'antimicobiogramma su terreni solidi a base di uova il laboratorista si può avvalere di tubi Lowenstein-Jensen antibiotati già preparati. Ad esempio, bioMérieux fornisce 26 tubi: di questi, quattro non sono antibiotati (due hanno pH 7,10 ed altri due pH 5,5); i successivi 20 sono antibiotati con quattro tubi per ciascun antibiotico in due concentrazioni diverse. I farmaci saggiati sono: isoniazide (0,2 e 1 $\mu g/ml$), etambutolo (2 e 3 $\mu g/ml$), streptomicina (4 e 10 $\mu g/ml$), acido paraminosalicilico (0,5 e 1 $\mu g/ml$), rifampicina (20 e 40 $\mu g/ml$), pirazinamide (200 $\mu g/ml$). I tubi per quest'ultimo hanno pH 5,5, ottimale per la sua attività micobattericida. Con questa tecnica, nel caso siano già stati osservati BAAR all'esame microscopico, si può insemenzare direttamente il campione biologico (saggio diretto) oppure si può partire dalla coltura (saggio indiretto). Il vantaggio del test diretto è la risposta più veloce (da 3 a 4 settimane) ma vi è lo svantaggio di maggiore frequenza delle contaminazioni.

Per l'esecuzione del metodo indiretto si devono prelevare 5-10 colonie e vortexarle con l'ausilio di bigliette di vetro in una provetta contenente Middlebrook 7H9 per ottenere una sospensione con una torbidità pari a 1 McFarland. A partire da questa si preparano diluizioni 10^{-3} e 10^{-5} . Ŝi prelevano 0,2 ml della diluizione 10⁻³ e si seminano nella prima serie di tubi antibiotati e nei tubi di controllo. Lo stesso procedimento è eseguito per la diluizione 10⁻⁵. I tubi devono essere incubati a 37 °C. Sono previste due letture, la prima a 28 giorni (definitiva in caso di resistenze), la seconda a 42 giorni. In quest'occasione si contano le colonie cresciute sul tubo di controllo e quelle cresciute su ciascun tubo antibiotato alle due diverse concentrazioni e si calcola il rapporto. Se questo è inferiore all'1%, il ceppo è sensibile, altrimenti è resistente. È necessario contare il numero di colonie presenti sui tubi di controllo. Infatti un buon inoculo iniziale comporta la crescita di 50-100 colonie. Un numero inferiore indica un inoculo non sufficiente con conseguenti false sensibilità; un numero maggiore ci fa pensare invece ad un inoculo troppo carico che potrebbe indirizzarci verso false resistenze (2) (Figura 20).

Se l'antimicogramma è eseguito su piastre di Middlebrook 7H10, queste dovranno essere divise in quadranti ed ogni quadrante dovrà contenere una concentrazione ben precisa di farmaco (Tabella 6.7.2).

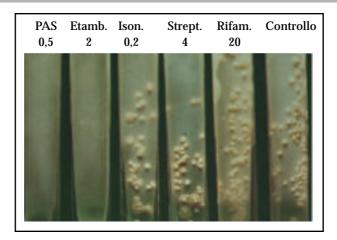


Figura 20. Antimicobiogramma eseguito secondo il metodo delle propor - zioni su tubi antibiotati (µg/ml) di Lowenstein-Jensen.

Piastra	Quadrante	Farmaco	Concentrazione µg/ml dischetto	Concentrazione µg/ml terreno		
1	I	Controllo 1	1	_		
	II	Isoniazide	1	0.2		
	III	Isonazide	5			
	IV	Etambuntolo	25	5		
2	I	Controllo 2	_	_		
	II	Streptomicina	10	2		
	III	Streptomicina	50	10		
	IV	Rifampicina	5	1		

Tabella 6.7.2. Concentrazioni critiche di antibiotico ($\mu g/ml$) per il saggio di sensibilità.

La procedura è sempre la stessa. L'inoculo però deve essere prelevato rispettivamente dalle diluizioni 10^{-2} e 10^{-4} . Una goccia di tale inoculo deve essere posta al lato di ciascun quadrato. Poi si incuba a 36 °C in atmosfera di $\rm CO_2$ pari al 5-10%. La lettura deve essere effettuata dopo circa 3 settimane ed anche in questo caso per essere certi che si è operato bene bisogna contare

almeno 50 colonie sul quadrato di controllo (2). Nel caso che l'antimicobiogramma venga eseguito con sistema MGIT, si inoculano 0,5 ml di una sospensione, pari a 0,5 di McFarland del ceppo in esame, in una serie di provette MGIT addizionate con le opportune concentrazioni dei singoli farmaci. La lettura delle provette contenenti l'antibiotico deve essere effettuata per 3 giorni a partire dalla positivizzazione della provetta di controllo. Quest'ultima invece deve essere letta ogni giorno, per un massimo di 14 giorni. Il ceppo deve essere considerato sensibile agli antibiotici presenti in provette che non presentano fluorescenza durante i primi 3 giorni di lettura. E' invece resistente agli antibiotici le cui provette mostrano fluorescenza al momento della positivizzazione del controllo o entro i due giorni successivi (2).

Il saggio su terreno radiometrico prevede l'inoculo di 0,1 ml di sospensione micobatterica pari a 0,5 McFarland (se non verrà effettuata la lettura durante il fine settimana) o 1 McFarland in ognuno dei flaconi Bactec 12B con il farmaco. Il flacone di controllo deve essere inoculato con 0,1 ml della sospensione diluita però 1/100. I flaconi devono essere letti per un minimo di 4 giorni fino ad un massimo di 14 giorni. Quando il Growth Index (GI) del controllo risulterà >30 sarà necessario per ciascun flacone contenente il farmaco valutare la differenza tra il GI dell'ultima lettura e quella del giorno precedente. Qualora tale differenza risulterà essere inferiore alla differenza del GI del flacone di controllo il ceppo è da considerarsi sensibile a tale farmaco, altrimenti è resistente. Se il GI del controllo è >30 già a partire dal primo o secondo giorno, l'inoculo è stato eccessivo per cui è necessario ripetere la semina. Per la lettura ci si avvale dello strumento Bactec 460 TB. Con questi ultimi due sistemi non è possibile testare la pirazinamide in quanto bisogna rispettare un pH dei terreni pari a circa 5,5. Il sistema Bactec comunque prevede, nel caso sia necessario testare proprio questo farmaco, l'utilizzazione di flaconi di brodo radiometrico a pH 6 (PZA Test medium, Becton Dickinson) (2).

7. La terapia

Il trattamento della tubercolosi, nonostante l'utilizzazione di protocolli ben standardizzati, non è così semplice da attuare come per altre malattie infettive. Infatti vi sono numerose variabili sia di tipo biologico, come la farmacoresistenza e le condizioni immunitarie del paziente, sia di tipo amministrativo, come il sistema burocratico di erogazione dei farmaci, che lo condizionano in modo significativo.

Altri fattori possono intervenire; basti pensare ad esempio alla gratuità dei farmaci, alla loro disponibilità in commercio o alla attiva adesione del paziente al lungo trattamento chemioterapico.

Oggi a livello mondiale il problema più evidente legato al controllo della malattia tubercolare è quello della corretta applicazione della terapia, in particolar modo nei paesi in via di sviluppo. In questi paesi purtroppo l'attuazione dei programmi nazionali di controllo e sorveglianza della tubercolosi presenta molte lacune e, nonostante l'aiuto dell'OMS e di altre organizzazioni sanitarie internazionali, i risultati di una corretta applicazione della terapia sono piuttosto scarsi e comunque al di sotto delle aspettative.

Ed è proprio in queste aree che si selezionano con sempre maggior frequenza ceppi tubercolari resistenti e multiresistenti.

Un cardine fondamentale dei vari programmi nazionali di controllo della malattia tubercolare riguarda l'ipotesi secondo la quale l'assunzione certa del farmaco rappresenta la migliore arma per prevenire la comparsa di resistenze.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha infatti stabilito di adottare una metodologia cosiddetta "D.O.T." (Directly Observed Treatment) per la quale la stessa assunzione del farmaco da parte del paziente deve avvenire sotto l'osservazione di un operatore sanitario. Questa metodologia di lavoro apparentemente semplice da attuare nei paesi industrializzati diventa invece problematica nei paesi in via di sviluppo, per la carenza degli stessi operatori sanitari. Si ipotizza che questa terapia DOT, proprio perché eseguita in modo incompleto, abbia aumentato la sopravvivenza dei malati cronici, e abbia quindi indirettamente favorito la diffusione dei ceppi resistenti e multiresistenti.

L'OMS definisce Resistenza Primaria quella che compare nei pazienti con tubercolosi che in precedenza non avevano mai assunto un farmaco antitubercolare, mentre viene definita Resistenza Secondaria quella che compare in pazienti che assumono farmaci antitubercolari da almeno un mese e che in precedenza non avevano questo tipo di resistenza.

La Resistenza Primaria è naturalmente di tipo genomico legata a muta-

zioni spontanee dei micobatteri con una frequenza di comparsa in genere molto bassa e comunque diversa da farmaco a farmaco. In tabella 7.1.1 sono indicate tali frequenze di mutazione.

Antibiotici	Frequenza
Isoniazide (H)	1 su 1.000.000 di bacilli
Rifampicina (R)	1 su 100.000.000 di bacilli
Etambutolo (E)	1 su 100.000 bacilli
Streptomicina (S)	1 su 10.000.000 bacilli

Tabella 7.1.1. Frequenza di mutazioni spontanee nelle Resistenze Primarie

Considerando che questi eventi mutageni sono indipendenti fra loro, la probabilità che sorga una resistenza combinata a più farmaci è data ovviamente dal prodotto della probabilità di ciascun farmaco, per cui ad esempio la probabilità che *Mycobacterium tuberculosis* sia resistente alla isoniazide e alla rifampicina sarà di 1 su 1.000.000 x 100.000.000, una probabilità dunque bassissima. Da ciò deriva che l'utilizzazione combinata di due o più farmaci rende la probabilità di resistenza quasi insignificante. Quindi si può affermare con ragionevole certezza che se i pazienti assumessero in modo corretto i farmaci prescritti per un periodo sufficientemente lungo guarirebbero quasi certamente tutti.

I farmaci utilizzati nei protocolli standard di terapia per la tubercolosi sono indicati in tabella 7.1.2. Essi vengono utilizzati all'interno di protocolli diagnostici la cui durata in genere non è mai inferiore ai 6 mesi.

Dalla tabella si evidenziano i farmaci cosiddetti di prima linea che sono in effetti quattro: Isoniazide, Rifampicina, Etambutolo e Streptomicina. Essi hanno anche un valore importante nella storia della lotta alla tubercolosi. Soprattutto i primi due farmaci, Isoniazide e Rifampicina, sono fondamentali nella terapia farmacologica e sono presenti quasi sempre nei vari protocolli terapeutici in associazione con altri farmaci di prima o seconda linea, tanto che la resistenza combinata a questi due farmaci, quando presente, definisce la cosiddetta MDR (Multi-Drug-Resistance). Questo tipo di resistenza quando è presente, pone seri problemi di guarigione della malattia.

In accordo con l'OMS (1) e con altri organismi internazionali come lo IUA-TLD i regimi terapeutici da attuare vengono divisi in 4 categorie, indicati dai

PRIMALINEA	SECONDALINEA				
	CLASSICI	NUOVI O SPERIMENTALI			
- Isoniazide (H)	- Ac. Paraminosalicilico	- Derivati della Rifampicina			
- Rifampicina ®	Etionamide/Protionamide	Ribabutina			
- Etambutolo (E)	- Cicloserina	Rifapentina			
- Pirazinamide (P)	- Capreomicina	- Chinoloni			
- Streptomicina (S)	- Amikacina	Ofloxacina			
		Ciprofloxacina			
		Sparfloxacina			
		Levofloxacina			
		Beta-Lattamici			
		Imipenem/cilastatina			

Tabella 7.1.2. Farmaci antitubercolari

numeri I, II, III, IV, che corrispondono dal punto di vista epidemiologico a differenti gradi di priorità clinica legati a loro volta alla possibilità più o meno certa di ottenere una guarigione (Tabella 7.1.3).

		Fase intensiva		Fase di continuazione		
Categoria	Casi	Durata	Regime	Durata	Regime	
I	Nuovi polmonari M+ Extrapolmonari gravi	2 mesi	HRZE	4 mesi	HR	
II	Recidive, fallimenti, persi al trattamento	2 mesi + 1 mese	HRZES HRZE	5 mesi	HRE	
III	Casi polmonari M- Casi extrapolmonari Non inclusi in cat.1	2 mesi	HRZ	4 mesi	HRE	
IV	Casi cronici da riferire a centri di elevata specializzazione					

Tabella 7.1.3. Schema classico di terapia antitubercolare.

Questo schema proposto, pur rappresentando un valido suggerimento di terapia polichemioantibiotica, rappresenta comunque una proposta di carat-

tere generale che deve poi raccordarsi alle condizioni cliniche del malato e ad altre variabili biologiche quali l'età del paziente, il sesso, la gravità della malattia, la presenza di altre malattie infettive o una gravidanza in corso. Se il paziente si trova in un paese nel quale è già presente un Programma Nazionale per la lotta alla tubercolosi potrà seguire lo schema terapeutico raccomandato dallo stesso programma.

Oggi sono attuati con maggior decisione protocolli di terapia cosiddetti brevi (short course therapy) (2, 3) con somministrazioni dei farmaci anche bisettimanali che godono di una maggiore compliance da parte del paziente e che hanno ridotto di molto gli insuccessi terapeutici con un relativo abbassamento delle resistenze indotte.

Il trattamento dei pazienti che presentano invece una MDR-TB (tubercolosi multiresistente a isoniazide e rifampicina) rappresenta una situazione molto impegnativa sia per il medico che per il paziente. Non è possibile utilizzare i farmaci cosiddetti di prima linea e bisogna invece spostarsi su quelli di seconda che sono in genere meno efficaci, con più effetti collaterali, molto più costosi e non sempre disponibili.

Prima di scegliere un regime chemioterapico adeguato in questa situazione è importante disporre di informazioni sicure sulla affidabilità di quei farmaci che possono essere ancora usati e quindi è necessario disporre di un laboratorio per la esecuzione dei test di sensibilità antibiotica affidabile la cui qualità sia controllata da un laboratorio nazionale o sopranazionale di riferimento. Una volta stabilita la sensibilità ai farmaci bisogna inserire nello schema terapeutico quelli di prima linea ancora non assunti dal paziente, in quanto è verosimile che i bacilli siano ancora sensibili a questi. Successivamente possono essere inseriti quelli di seconda linea.

Quello che è importante sottolineare è che l'insorgenza di MDR-TB è dovuta o ad una prescrizione inadeguata in termini di tempo e dosaggio o ad una mancata osservanza da parte del paziente nell'assunzione dei farmaci.

Per questo tutti gli sforzi dei vari programmi nazionali della tubercolosi presenti nei vari paesi industrializzati e non, dovrebbero tendere a gestire meglio questo tipo di controllo per evitare insuccessi nella terapia (4).

8. Il controllo della malattia tubercolare

La tubercolosi è una malattia infettiva cronica che negli ultimi decenni ha assunto i connotati di una vera e propria emergenza mondiale complicata dal carattere di multiresistenza. Per questo soprattutto nei paesi non industrializzati rischia di divenire virtualmente incurabile (1).

Per tale ragione oggi si sono sempre più diffusi, nei paesi ad elevata prevalenza, dei Programmi di Controllo della tubercolosi che consistono nell'utilizzare le risorse economiche e umane disponibili per prevenire, diagnosticare e trattare la malattia nel modo migliore e più economico possibile.

L'esperienza ha dimostrato che il programma ha maggiori probabilità di successo se viene concordato e discusso con tutti coloro che nel paese hanno una posizione strategica all'interno del tessuto sociale organizzato, quali politici, amministratori, dirigenti sanitari e tutti coloro che entrano nella gestione di strutture sanitarie territoriali quali operatori di laboratori, di ospedali, di istituti scientifici, di Università (2).

La convergenza di tutte queste esperienze raggiunge il suo momento di sintesi nella attivazione di seminari di educazione sanitaria sulla tubercolosi mediante la radio o la televisione o altri mezzi di comunicazione, al fine di informare la popolazione sul contenuto del Programma di Controllo e quindi sulle modalità di trasmissione, diagnosi, cura e prevenzione della malattia.

L'attuazione di questa parte dei Programmi di Controllo ad impronta educativa deve essere sostenuta da altri interventi più specificamente sanitari, come ad esempio la ricerca del BK nell'escreato in pazienti che hanno tosse produttiva da più di 3 settimane, oppure la esecuzione dei test alla tubercolina nella popolazione presente in un'area a forte prevalenza, o ancora lo studio della farmaco-sensibilità per avere informazioni utili sulla diffusione dei ceppi selvaggi resistenti.

Anche i programmi vaccinali con il BCG e le terapie di profilassi per gli individui a rischio in particolari ambienti di lavoro devono far parte degli obiettivi del Programma di Controllo.

Questi programmi devono attuarsi in collaborazione con i medici di base che in questo progetto devono essere coinvolti in un rapporto di integrazione molto stretto.

Secondo la normativa vigente non appena sussista il sospetto di tubercolosi (esame microscopico positivo) o quando venga posta una diagnosi certa della malattia, bisogna notificare e registrare il caso agli organi sanitari competenti. Questa procedura di per sé molto noiosa e burocratica è in realtà indispensabile perché rappresenta l'unica fonte sicura di informazioni. La tubercolosi è sicuramente una malattia curabile, ma ciò che è molto importante è la prevenzione. Questa è possibile solo creando un valido gruppo di esperti dotati della necessaria autorità e dell'indispensabile entusiasmo per garantire il controllo della malattia. È questo l'obiettivo ultimo che gli organi competenti devono prefiggersi (3).

Bibliografia

Riferimenti bibliografici - Introduzione

- 1. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle. 72:1-6, 1991.
- Raviglione M.C., Snider D.E., Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA. 273:220-226, 1995.
- 3. Tuberculosis a global emergency: WHO report on the TB epidemic. World Health Organization. WHO/TB 94-177,1994.
- 4. Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., de Kantor I., Meslin F.X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Em. Inf. Dis. 4:59-70, 1998.
- 5. Nardini S., Migliori G.B., Favarelli B., Besozzi G., Raviglione M.C., Spinaci S. La prevalenza della Tubercolosi in Italia sta veramente crescendo? Osservazione sui dati OMS e nazionali. Atti del 9° Corso avanzato di Medicina Interna di Palermo. 1997.
- Migliori G.B., Di Pisa G., Capecchi V., Favarelli B. Gruppo di Studio AIPO Tubercolosi. Protocollo per il controllo della Tubercolosi in Italia. Collana Monografica della Rassegna di Patologia dell'Apparato Respiratorio. Pacini editore, Pisa, 1995.
- Ambrosetti M., Besozzi G., Codecasa L.R., Farris B., Nutini S., Saini L., Casali L., Cardini S., Migliori G.B. The Italian AIPO study on tuberculosis treatment results, report 1997. National AIPO "Tuberculosis" Study Group. Monaldi Arch. Chest Dis. 54:407-412, 1999.

Riferimenti bibliografici - Capitolo 2

1. Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. Microbiologia. EdiSES, 2000.

2. Runyon E.H. Anonymus mycobacteria in pulmonary disease. Med. Clin. North Am. 43: 273-290, 1959.

Riferimenti bibliografici - Capitolo 3

 Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R. Jr., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C.Jr. Testo Atlante di Microbiologia Diagnostica. Antonio Delfino Editore, 1995.

Riferimenti bibliografici - Capitolo 4

- 1. Orme I.M., Anderson P., Boom W.H. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 167:1481-1497, 1993.
- 2. Dannenberg A.M.jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev. Infect. Dis. 2:369-378, 1989.
- 3. Lagrange P.H., Hurtrel B., Brandley M., Thickstun P.M. Immunological mechanism controlling mycobacterial infections. Bull. Eur. Phys. Resp. 19:163-172, 1983.
- 4. Dunlap N., Briles D. Immunology of Tuberculosis. Med. Clin. N. Amer. 77:1235-1259, 1989.
- 5. Orme I. M. Immunity to Mycobacteria. Curr. Op. Immunol. 5:497-502, 1993.
- 6. Ippoliti F., Santoro C., Paris D., Salim S., Mancini P.A. Ruolo dei monociti nella tubercolosi polmonare. Giorn. It. Allergol. Immunol. Clin. 1:157-163, 1991.
- 7. Ellner J.J. Immune disregulation in human tuberculosis. J. Lab. Clin. Med. 108:142, 1986.
- 8. Huebner R.E., Schein M.F., Bass J.B.jr. The tuberculin skin test. Clin. Infect. Dis. 17:968-975, 1993.
- 9. Haas D.W., Des Prez R.M. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell, Douglas, Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. (Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. ed) Churchill Livingstone, New York, pp 2213-2243, 1995.



- 10. Del Prete R., Picca V., Mosca A., D'Alagni M., Miragliotta G. Detection of anti-lipoarabinomannan antibodies for the diagnosis of active tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2:160-163, 1998.
- 11. Anzalone G. Cenni di Immunologia della Tubercolosi. Collana Scientifica Eurospital. T.R. Editrice. 1993.

Riferimenti bibliografici - Capitolo 5

- 1. Crofton J., Norman H., Miller F. Diagnosi e Terapia della Tubercolosi. Edizioni AIPO Scientifica. Pacini Editore. 1995.
- 2. Haas D.W., Des Prez R.M. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell, Douglas, Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. (Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. ed) Churchill Livingstone, New York, pp 2213-2243, 1995.

Bibliografia - Capitolo 6

- 1. Finegold S.M., Martin W.J. Diagnostica Microbiologica. Piccin Nuova Libraria. S.p.A., Padova, 1989.
- 2. Tortoli E. Micobatteriologia. Quaderni di Microbiologia Clinica. Biomedia s.r.l., 1999.
- 3. Peterson E.M., Nakasone A., Platon-DeLeon J.M., Jang Y., De La Maza L.M., Desmond E. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium spp. J. Clin. Microbiol.* 37:3564-3568, 1999.
- 4. Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti M.T., Gesu G., Nista D. Use of Bactec MGIT 960 for recovery of *Mycobacteria* from clinical specimens: multicenter study. J. Clin. Microbiol. 37:3578-3582, 1999.
- 5. Cambau E., Wichlacz C., Truffot-Pernot C., Jarlier V. Evaluation of the new MB Redox System for detection of growth of *Mycobacteria*. J. Clin. Microbiol. 37:2013-2015, 1999.
- 6. Somoskovi A., Kodmon C., Lantos A., Bartfai Z., Tamasi L., Fuzy J., Magyar P. Comparison of recoveries of Mycobacterium tuberculosis using



- the automated BACTEC MGIT 960 System, the BACTEC 460 TB System, and Lowenstein-Jensen medium. J. Clin. Microbiol. 38:2395-2397, 2000.
- 7. Roggenkap A., Hornef M.W., Masch A., Aigner B., Autenrieth I.B., Heesemann J. Comparison of MB/BacT and BACTEC 460 TB System for recovery of *Mycobacteria* in a routine diagnostic laboratory. J. Clin. Microbiol. 37:3711-3712, 1999.
- 8. Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R. Jr., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C.Jr. Testo Atlante di Microbiologia Diagnostica. Antonio Delfino Editore. 1995.
- 9. Hannan M.M., Desmond E.P., Morlock G.P., Mazurek G.H., Crawford J.T. Pyrazinamide-Monoresistent *Mycobacterium tuberculosis* in the United States. J. Clin. Microbiol. 39:647-650, 2001.
- Luquin M., Lopez F., Ausina V. Capillary gas chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products, cellular fatty acids, and alcohols of Mycobacterium xenopi. J. Clin. Microbiol. 22:1403-1406, 1989.
- 11. Luquin M., Ausina V., Lopez Calahorra F., Garcia Barcelo' M., Celma C., Prats G. Evaluation of practical chromatographic procedures for identification of clinical isolates of *Mycobacteria*. J. Clin. Microbiol. 29:120-130, 1991.
- 12. Chou S., Chedore P., Kasatiya S. Use of gas chromatographic fatty acid and mycolic acid cleavage product determination to differentiate among Mycobacterium genavense, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium simiae, and Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 36:577-579, 1998.
- 13. Butler W.R., Kilburn J.O. Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and Mycobacterium gordonae by High-Performance Liquid Chromatography of their mycolic acids. J. Clin. Microbiol. 26:50-53, 1998.
- 14. Kellogg J.A., Bankert D.A., Withers G.S., Sweimler W., Kiehn T.E., Pfyffer G.E. Application of the Sherlock Mycobacteria Identification System using High-Performance Liquid Chromatography in a clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. 39:964-970, 2001.
- 15. Butler W.R., Guthertz L.S. Mycolic acid analysis by High-Performance Liquid Chromatography for identification of *Mycobacterium Species*. Clin. Microbiol. Rev. 14:704-726, 2001.

- 16. Butcher P.D., Hutchinson N.A., Doran T.J., Dale J.W. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial disease. J. Ap. Bac. 81:53-71S, 1996.
- 17. Labombardi V.J., Carter L., Massarella S. Use of nucleic acid probes to identify *Mycobacteria* directly from Difco ESP-Myco Bottles. J. Clin. Microbiol. 35:1002-1004, 1997.
- 18. Badak F.Z., Goksel S., Sertoz R., Nafile B., Ermertcan S., Cavusoglu C., Bilgic A. Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. J. Clin. Microbiol. 37: 1602-1605, 1999.
- 19. Arnold L.J., Hammond P.W., Wiese W.A., Nelson N.C. Assay formats involving acridium-ester-labelled DNA probes. Clin. Chem. 35:1588-1594, 1989.
- 20. Somoskovi A., Hotaling J.E., Fitzgerald M., Jonas V., Stasik D., Parsons L.M., Salfinger M. False-positive results for *Mycobacterium celatum* with the AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* complex assay. J. Clin. Microbiol. 38:2743-2745, 2000.
- 21. D'Amato R.F., Wallman A.A., Hochstein L.H., Colaninno P.M., Scardamaglia M., Ardila E., Ghouri M., Kim K., Patel R.C., Miller A. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using ROCHE AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. J. Clin. Microbiol. 33:1832-1834, 1995.
- 22. Longo M.C., Beringer M.S., Hartley J.L. Use of uracile DNA glycolylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. Gene. 93:125-128, 1990.
- 23. Jonas V., Alden M.J., Curry J.I., Kamisango K., Knott C.A., Lankford R., Wolfe J.M., Moore D.F. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. 31:2410-2416, 1993.
- 24. Gamboa F., Fernandez G., Padilla E., Manterola J.M., Lonca J., Cardona P.J., Matas L., Ausina V. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified Direct Test for direct detection of Mycobacterium Tuberculosis in respiratory and non-respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 36:684-689, 1998.



- 25. pargo C.A., Fraiser M.S., Van Cleve M., Wqright D.J., Nycz C.M., Spears P.A., Walzer G.T. Detection of *M. tuberculosis* DNA using Thermophilic Strand Displacement Amplification. Molecular and cellular probes. 10:247-256, 1996.
- 26. Ichiyama S., Ito Y., Sugiura F., Inuma Y., Yamori S., Shimojima M., Hasegawa Y., Shimokata K., Nakashima N. Diagnostic value of the Strand Displacement Amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting Mycobacteria in sputum samples. J. Clin. Microbiol. 35:3082-3085, 1997.
- 27. Cuboni A. Sierologia della tubercolosi. Microbiologia Medica. 10:19-20, 1995.
- 28. Del Prete R., Picca V., Mosca A., D'Alagni M., Miragliotta G. Detection of anti lipoarabinomannan antibodies for the diagnosis of active tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2:160-163, 1998.
- 29. Miragliotta G., Mosca A., D'Alagni M., Basile V., Fumarola L., Del Prete R. Recenti contributi del laboratorio di microbiologia nella diagnostica della malattia tubercolare. L'Igiene moderna. 110:629-640, 1998.
- 30. Canetti G., Froman S., Grosset J., Hauduroy P., Langerova M., Mahler H.T., Meisner G., Mitchinson D.A., Sula L. *Mycobacteria*: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull. WHO. 29:565-578, 1963.
- 31. Eltringham I.J., Wilson S.M., Drobniewski F.A. Evaluation of a bacteriophage-based assay (phage amplified biologically assay) as a rapid screen for resistance to Isoniazide, Ethambutol, Streptomycin, Pyrazinamide, and Ciprofloxacin among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 37:3528-3532, 1999.

Riferimenti bibliografici - Capitolo 7

- 1. World Health Organization, Treatment of tuberculosis, Guidelines for national programs. World Health Organization. Geneva, 1993.
- 2. Angel J.H. Short-course therapy in pulmonary tuberculosis. J. Antimicr. Chemother. 1326-1335, 1977.



- 3. Horne N.W. Short-course chemotherapy of tuberculosis. In: Flenley D.C., Petty T.L. (eds.), Recent Advances in Respiratory Medicine. Churchill Livingstone, Londra. 3: 223, 1983.
- 4. WHO/IUATLD Global Working Group on Antituberculosis Drug Resistance, Surveillance. Guidelines for Surveillance of drug Resistance in tuberculosis. Geneva, WHO/TB/96.216:1-35.

Riferimenti bibliografici - Capitolo 8

- 1. Tenover F.C., Crawford J.T., Huebner R.E., Geiter L.J., Horsburgh C.R. Jr., Good R.C. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? J. Clin. Microbiol. 31:767-770, 1993.
- 2. Blumberg M.M., Watkins D.L., Berskling J.D. Preventing the nosocomial transmission of tuberculosis. Ann. Intern. Med., 122:658-663, 1995.
- 3. Tuberculosis: a global emergency. WHO report on the TB epidemic. World Health Organization. WHO/TB94-177, 1994.

Indice

Editorialepag.	3
Premessa»	5
1. Introduzione»	7
2. Tassonomia dei micobatteri»	10
3. Caratteristiche morfologiche, strutturali e di crescita dei	
micobatteri»	13
4. Patogenesi e immunità della tubercolosi »	15
5. La clinica	22
6. La diagnostica di laboratorio della tubercolosi »	27
7. La terapia»	62
8. Il controllo della malattia tubercolare»	66
Bibliografia»	68
Indice »	75

Caleidos copio

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SPA

- 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 -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 e 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 opportu-nistiche 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., Simonetti M.T.: I micobatteri. Maggio '90.
- 52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: Anticorpi antinucleo. Giugno '90.
- 53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: Le macchine in terapia intensiva. Luglio '90.
- 54. Goracci E., Goracci G.: Gli allergo-acari. Agosto '90.
- 55. Rizzetto M.: L'epatite non A non B (tipo C). Settembre '90.
- 56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: Infezione da HIV-1: patoge nesi ed allestimento di modelli animali. Ottobre '90.
- 57. La Vecchia C. Epidemiologia e prevenzione del cancro (I). Gennaio '91.
- 58. La Vecchia C. Epidemiologia e prevenzione del cancro (II). Febbraio '91.
- 59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: Le molecole dell'adesi vità nelle cellule immunocompetenti. Marzo '91.
- 60. Bedarida G., Lizioli A.: La neopterina nella pratica clinica. Aprile '91.
- 61. Romano L.: Valutazione dei kit immunochimici. Maggio '91.
- 62. Dondero F. e Lenzi A.: L'infertilità immunologica. Giugno '91.
- 63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: Gli Oncogèni. Luglio '91.
- 64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *In fezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
- 65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni. Settembre '91.
- 66. Gentilomi G.A.: Sonde genetiche in microbiologia. Ottobre '91.
- 67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: Le sonde di DNA e la virulenza batterica. Gennaio '92.
- 68. Zilli A., Biondi T.: Il piede diabetico. Febbraio '92.
- 69. Rizzetto M.: L'epatite Delta. Marzo '92.

- 70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: Gli screening neonatali. Aprile '92.
- 71. Tavani A., La Vecchia C.: Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari. Luglio '92.
- 72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
- 73. Contu L., Arras M.: Molecole di membrana e funzione immunologica (I). Settembre '92.
- 74. Ferrara S.: Manuale di laboratorio I. Ottobre '92.
- 75. Gori S.: Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti. Novembre '92.
- 76. Ferrara S.: Manuale di laboratorio II. Gennaio '93.
- 77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: Ipertensione Arteriosa. Febbraio '93.
- 78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: I linfomi non Hodgkin. Marzo '93.
- 79. Arras M., Contu L.: Molecole di membrana e funzione immunologica (II). Aprile '93.
- 80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: Terapia antiretrovirale. Maggio '93.
- 81. Rizzetto M.: L'epatite C. Settembre '93.
- 82. Andreoni S.: Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti. Ottobre '93.
- 83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: Diagnostica con radio nuclidi del Morbo di Graves-Basedow. Novembre '93.
- 84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: Chemiluminescenza. Dicembre '93.
- 85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: Applicazioni degli esami immunologici. Gennaio 94.
- 86. Arras M., Contu L.: Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B. Febbraio '94.
- 87. Rossetti R.: Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB). Marzo '94.
- 88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: Marcatori biochimici del rimodel lamento osseo. Aprile '94.
- 89. Fanetti G.: Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare. Settembre '94.
- 90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario. Ottobre '94.
- 91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: Helicobacter pylori. Novembre '94.
- 92. Parazzini F.: L'epidemiologia della patologia ostetrica. Febbraio '95.
- 93. Proietti A., Lanzafame P.: Il virus di Epstein-Barr. Marzo '95.
- 94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: Im munoflogosi nell'asma bronchiale. Maggio '95.
- 95. Manduchi I.: Steroidi. Giugno '95.
- 96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale. Luglio '95.
- 97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani. Ottobre '95.
- 98.La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica. Dicembre '95.
- 99.Zilli A., Biondi T., Conte M.: Diabete mellito e disfunzioni conoscitive. Gennaio '96.
- 100.Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma. Marzo '96.
- 101. Cogato I. Montanari E.: La Sclerosi Multipla. Aprile '96.
- 102.Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale.* Maggio '96.
- 103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.



- 104. Marcante R., Dalla Via L.: Il virus respiratorio sinciziale. Luglio '96.
- 105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative. Ottobre '96.
- 106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale. Novembre '96.
- 107. Morganti R.: Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali. Dicembre '96.
- 108. Andreoni S.: Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti. Gennaio '97.
- 109. Salemi A., Zoni R.: Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi. Febbraio '97.
- 110.Meisner M.: Procalcitonina. Marzo '97.
- 111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: Malattie a trasmissione sessuale (2). Aprile '97.
- 112.Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: Biosensori elettrochimici in Biomedicina. Maggio '97.
- 113. Valtriani C., Hurle C.: Citofluorimetria a flusso. Giugno '97.
- 114.Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: Alcol e problemi correlati. Settembre '97.
- 115. Piccinelli M.: Depressione Maggiore Unipolare. Ottobre '97.
- 116.Pepe M., Di Gregorio A.: Le Tiroiditi. Novembre '97.
- 117. Cairo G.: La Ferritina. Dicembre '97.
- 118.Bartoli E.: Le glomerulonefriti acute. Gennaio '98.
- 119.Bufi C., Tracanna M.: Computerizzazione della gara di Laboratorio. Febbraio '98.
- 120. National Academy of Clinical Biochemistry: Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide. Marzo '98.
- 121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: L'ansia. Aprile '98.
- 122.Cinco M.: La Borreliosi di Lyme. Maggio '98.
- 123. Giudice G.C.: Agopuntura Cinese. Giugno '98.
- 124.Baccini C.: Allucinogeni e nuove droghe (1). Luglio '98.
- 125.Rossi R.E., Monasterolo G.: Basofili. Settembre '98.
- 126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1. Novembre '98.
- 127.Baccini C.: Allucinogeni e nuove droghe (11). Dicembre '98.
- 128.Muzi P., Bologna M.: Tecniche di immunoistochimica. Gennaio '99.
- 129.Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivira li*. Febbraio '99.
- 130.Castello G., Silvestri I.: Il linfocita quale dosimetro biologico. Marzo '99.
- 131.AielloV., Caselli M., Chiamenti C.M.: Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori correla ta. Aprile '99.
- 132.Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.
- 133.Rossi R.E., Monasterolo G.: Eosinofili. Giugno '99.
- 134.Fusco A., Somma M.C.: NSE (Enolasi Neurono-Specifica). Luglio '99.
- 135. Chieffi O., Bonfirraro G., Fimiani R.: La menopausa. Settembre '99.
- 136.Giglio G., Aprea E., Romano A.: Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi. Ottobre '99.
- 137.Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati. Novembre '99.
- 138. Giovanella L.: Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica. Dicembre '99.
- 139. Paladino M., Cerizza Tosoni T.: *Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*. Gennaio 2000.



- 140.La Vecchia C.: Come evitare la malattia. Febbraio 2000.
- 141.Rossi R.E., Monasterolo G.: Cellule dendritiche, Marzo 2000.
- 142.Dammacco F.: Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I). Aprile 2000.
- 143.Dammacco F.: Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II). Maggio 2000.
- 144. Croce E., Olmi S.: Videolaparoscopia. Giugno 2000.
- 145.Martelli M., Ferraguti M.: Allergo Gest. Settembre 2000.
- 146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: TTP e sindromi correlate: nuovi oriz-zonti diagnostici e terapeutici. Gennaio 2001.
- 147.Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: L'umanizzazione dei servizi sanitari. Febbraio 2001.
- 148. Giovanella L.: I tumori della tiroide. Marzo 2001.
- 149.Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: L'ipertensione arteriosa. Aprile 2001.
- 150. The National Academy of Clinical Biochemistry: Linee guida di laboratorio per lo scree ning, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico. Settembre 2001.
- 151. Dominici R.: Riflessioni su Scienza ed Etica. Ottobre 2001.
- 152.Lenziardi M., Fiorini I.: Linee guida per le malattie della tiroide. Novembre 2001.
- 153. Fazii P.: Dermatofiti e dermatofitosi. Gennaio 2002.
- 154. Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: Le malattie infiamma torie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica. Febbraio 2002.
- 155. Trombetta C.: Il Varicocele. Marzo 2002.
- 156. Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: Ambiente e polmone. Aprile 2002.
- 157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I Markers tumorali. Maggio 2002.
- 158. Loviselli A., Mariotti S.: La Sindrome da bassa T3. Giugno 2002.
- 159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte*. Ottobre 2002.
- 160. Canini S.: Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato. Novembre 2002.
- 161. Atzeni M.M., Masala A.: La -talassemia omozigote. Dicembre 2002.
- 162. Di Serio F.: Sindromi coronariche acute. Gennaio 2003.
- 163. Muzi P., Bologna M.: Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario. Febbraio 2003.
- 164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche. Marzo 2003.
- 165. Magrì G.: Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico. Aprile 2003.
- 166. Rapporto dello Hastings Center: Gli scopi della medicina: nuove priorità. Maggio 2003.
- 167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: Il sonno e le sue alterazioni. Giugno 2003.
- 168. Macchia V., Mariano A.: Marcatori tumorali nel cancro della vescica. Luglio 2003.
- 169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: *La Turbercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.

I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina

anno 21, numero 169

Direttore Responsabile

Sergio Rassu Tel. mobile 338 2202502 E-mail: sergiorassu@libero.it

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

Progettazione e Realizzazione



Restless Architect of Human Possibilities s.a.s.

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Carmela Tiberti

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia Flavio Damarciasi

EDITORE

futuro ha il cuose antico - MEDICAL SYSTEMS SPA

Via Rio Torbido, 40 16165 Genova (Italy) Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso); Telefax 010/8340310-809070.

Internet URL: http://www.medicalsystems.it La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato, Caleidoscopio Letterario, Giornale della Associazione per l'Automazione del Laboratorio, Guida Pratica Immulite[®], Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

LA STAMPA - Industrie Grafiche S.p.A. Salita Pino Sottano, 3/C - Genova Tel. 010 8360167 - Fax 010 8367321

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996 Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa nº 2661 del 2 Settembre 1989 Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) nº 1188

> Finito di stampare: Agosto 2003 Sped. in Abb. Post. 45%

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.

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