

# Caleidoscopio

*Italiano*



Maria Gabriella Mazzarello, Manuela Arata, Mascja Perfumo, Anna Marchese, Eugenio Agenore Debbia

## Tubercolosi e micobatteri

Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**

# 204

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

# EMERGING INFECTIOUS DISEASES

A Peer-Reviewed Journal Tracking and Analyzing Disease Trends

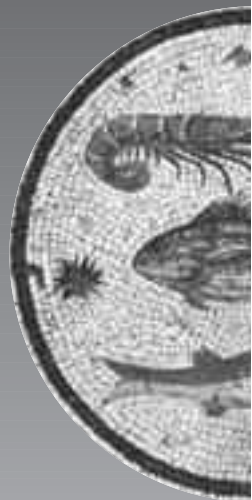
EID  
Online

Foodborne Disease



# Caleidoscopio

*Italiano*



Maria Gabriella Mazzarello, Manuela Arata, Mascja  
Perfumo, Anna Marchese, Eugenio Agenore Debbia

*Laboratorio Analisi P.O. Ovada (AL)*

## Tubercolosi e micobatteri

Direttore Responsabile  
Sergio Rassu

# 204

... 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 ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a 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.

**FRONTISPIZIO.** 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.

**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 il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti 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 acconsentendo il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo:

Restless Architect of Human Possibilities sas  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari

# Caleidoscopio

*Italiano*

## Editoriale

Dr.ssa Maria Gabriella Mazzarello, Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università di Genova, ha conseguito la Specializzazione in Igiene con Orientamento di Laboratorio presso l'Università di Genova.

Referente del Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale di Ovada, ASL 22. Responsabile Struttura Semplice di Microbiologia e Parassitologia, Settore di Allergologia del Laboratorio dell'ASL 22 (Acqui Terme, Novi Ligure, Ovada).

Responsabile di Eventi Formativi, Relatore e Moderatore di numerosi Corsi, Convegni, Seminari su: Allergologia, Ematologia, Sierologia, Microbiologia, Immunometria e Sistemi Gestione Qualità.

Docente presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia Un. di Novara per Corsi di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico per Biochimica Clinica-Enzimologia/Certificazione dei Processi Diagnostici del Controllo Interno; Diploma Universitario per I. Professionali ed Igienisti dentali per Microbiologia Clinica, Un. di Torino e di Novara, Facoltà di Medicina e Chirurgia. Membro Commissione Esame di Stato, Un. di Genova ed Alessandria.

Relatore e Correlatore di Tesi di Laurea in Sc. Biologiche, presso Un. di Genova ed Alessandria e di Tesi di Specializzazione in Microbiologia e Virologia, Un. di Genova.

Coordinatore del Gruppo di Lavoro dei Laboratori Pubblici Piemontesi su Protocollo Operativo, Regione Piemonte, Assessorato alla Sanità: Determinazione ed utilizzo delle IgE Totali ed IgE Specifiche nella Diagnostica Allergologica in vitro e Monitoraggio Regionale relativo. Membro Comitato Infezioni Ospedaliere ASL 22.

Autrice e Coautrice di oltre 40 tra pubblicazioni su Riviste Internazionali e Nazionali.

Dr.ssa Manuela Arata, Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", sede di Alessandria, abilitata alla professione di Biologo. Specializzanda in Patologia Clinica presso l'Università degli Studi di Pavia. Internato presso il Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale di Ovada, ASL 22 per Tesi di Laurea su Applicazione alla micobatteriologia di tecniche di amplificazione genica e di rilevamento in fluorescenza.

Volontaria, Tirocinante e da Aprile 2005 Borsista presso la S.O.C. di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Laboratorio HLA, dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo" di Alessandria per Tipizzazione genomica con tecniche di sequenziamento e colture di cellule somatiche da destinare alla terapia cellulare autologa rigenerativa. Coautrice di alcune pubblicazioni.

Dr.ssa Mascja Perfumo, Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Genova, abilitata alla professione di Biologo. Ha svolto internato presso il Laboratorio

Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale di Ovada (ASL 22) per Tesi di Laurea Sperimentale sulla Diagnostica Allergologica in Vitro e Monitoraggio Pollinico.

Specializzanda in Microbiologia e Virologia presso l'Università degli Studi di Genova. Docente presso l'Istituto di Avviamento al Lavoro (IAL) di Genova per Norme Igieniche Sanitarie e HACCP.

Incarico Libero Professionale presso ASL 22 (Acqui Terme, Novi Ligure, Ovada), Laboratorio Analisi Ospedale di Ovada, per Progetto di Monitoraggio Aerobiologico su tutto il territorio ASL 22, dal 01/06/04 ad oggi e sul territorio di Casale Monferrato ASL 21.

Coautrice di pubblicazioni su: "Eziopatogenesi e diagnostica allergologica", "The degree of serological sensitization to cat allergen in Patients with or without cat at home" e "Aerobiologia ed Allergopatie".

Discente in Corsi e Convegni relativi a Microbiologia, Allergologia, Aerobiologia, Biochimica, Immunometria, Stesura di Linee Guida, Protocolli Diagnostici e Normative sugli Alimenti.

Prof.ssa Anna Marchese, Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Genova, Professore Associato di Microbiologia e Microbiologia Clinica presso la Sezione di Microbiologia C.A. Romazi del Di.S.C.A.T dell'Università degli Studi di Genova. Coordina i Laboratori di Genetica, Biologia Molecolare ed Epidemiologia delle resistenze batteriche della Sezione di Microbiologia C.A. Romazi del Di.S.C.A.T dell'Università degli Studi di Genova.

Dottorato di ricerca in Scienze Microbiologiche presso l'Istituto di Microbiologia, Università di Genova.

Specializzazione in Microbiologia e Virologia.

Relatore e Discente in Corsi e Congressi sia in Italia che all'Estero. Autrice di oltre 200 tra pubblicazioni su Riviste Internazionali e Nazionali.

Prof. Eugenio Agenore Debbia, Laureato in Scienze Biologiche, Direttore della Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia presso l'Università di Genova. Professore Ordinario in Microbiologia, Docente in Microbiologia e Microbiologia Clinica nel corso di Laurea di Odontoiatria e Protesi Dentaria, in 5 Corsi di Lauree Brevi. Docente in 5 Scuole di Specializzazione, Insegnante incaricato di Microbiologia Clinica presso la Facoltà di Scienze.

Membro del Comitato Studio antimicrobici e del Comitato per la lotta contro le Infezioni Ospedaliere (CIO), Azienda Ospedaliera Ospedale S. Martino, Genova. Editore di Microbiologia Medica. Membro del Direttivo della Società Italiana di Microbiologia (SIM).

Delegato Regionale per la Liguria dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) e, ad oggi, Membro del Direttivo AMCLI. Referente per i corsi di accreditamento per Educazione Continua in Medicina (ECM).

Membro di numerose Società Scientifiche Nazionali (SIM, SIMMOC, AMCLI) ed Internazionali (ASM, ESCMID).

Autore di oltre 500 tra pubblicazioni su Riviste Internazionali e Nazionali, di un libro di testo di Microbiologia, di capitoli libri e relazioni a Congressi Internazionali e Nazionali.

**Sergio Rassu**

## Introduzione

La Tubercolosi o TBC, conosciuta fin dall'antichità, ha afflitto l'umanità da millenni. Raggiunse proporzioni epidemiche durante i più importanti periodi di urbanizzazione nel XVIII e nel XIX secolo, quando mortalità e morbilità erano molto alte. È soprattutto dalla fine del XIX secolo, con la scoperta nel 1882 dello scienziato tedesco Robert Koch (Klausthal, Hannover 1843 - Baden-Baden 1910) (12), dell'agente eziologico coinvolto: *Mycobacterium tuberculosis* o BK (Bacillo di Koch), che inizia l'era della conoscenza scientifica della patologia tubercolare (26).

La Tubercolosi, malattia infettiva, contagiosa, a decorso cronico, si distingue dalle altre malattie infettive per la complessa patogenesi, i quadri clinici variabili ed i particolari meccanismi immunitari (2).

La malattia comporta una notevole morbilità e mortalità, manifestandosi sia in sedi polmonari (la maggiore parte dei casi) che extrapolmonari. Si caratterizza, inoltre, per una curva epidemica che dura secoli; tempo durante il quale si distinguono: una fase iniziale, una fase di transizione ed una fase endemica (21). Nei Paesi occidentali, sia per l'isolamento dei malati contagiosi nei Sanatori, sia per il diffuso miglioramento delle condizioni di vita della popolazione, la Tubercolosi ha iniziato a diminuire alla fine del XIX secolo. Poi, con l'avvento della terapia antitubercolare, la mortalità e, più gradualmente l'incidenza, si sono ridotte a livelli trascurabili (25).

All'inizio degli anni Ottanta la Tubercolosi sembrava essere nei Paesi Occidentali sulla strada dell'eradicazione definitiva ed almeno sotto controllo nei Paesi in via di sviluppo. Inaspettatamente, nel decennio successivo, si è invece, riaffacciata in tutto il mondo, come una vera e propria minaccia per l'uomo, con stime epidemiologiche allarmanti: si è così resa necessaria una rivalutazione del problema e nel 1993 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ha dichiarato la TBC "un'emergenza mondiale" (9). Segue che, nonostante le importanti conquiste terapeutiche e profilattiche, registrate a partire dagli anni '60, con l'avvento di antibiotici a diretta azione anti Micobatterica e l'applicazione della vaccinazione, la Tubercolosi resta, per alcune fasce di popolazione, una malattia che suscita timori, per la triste fama di affezione cronica e per la frequente evoluzione, almeno in passato, consuntiva e mortale (2).

Costituisce un problema di salute pubblica in tutto il Mondo, non solo nei Paesi in via di sviluppo, ove si registrano tassi di incidenza pressoché epidemici, ma anche nei Paesi industrializzati soprattutto in popolazioni a rischio quali i pazienti affetti da AIDS e gli immigrati (25).

Circa 10-15 milioni di persone negli Stati Uniti contraggono l'infezione da



*M. tuberculosis* e solo nel 1994 sono stati denunciati più di 24000 casi di Tubercolosi. E' una malattia che necessita una sorveglianza assidua a causa dei movimenti migratori dai Paesi di forte endemia e del rischio di farmacoresistenza (35).

Negli ultimi venticinque anni il "killer Tubercolosi" ha ricominciato a colpire nei Paesi industrializzati. Nei Paesi in via di sviluppo, invece, la Tubercolosi è stata e continua ad essere un fenomeno molto grave (25). Ad oggi esistono grandi differenze nell'incidenza della malattia; si va da aree con un'incidenza stimata superiore a 100/100.000 (gran parte dell'Asia e dell'Africa), ad aree con incidenza tra 25 e 100/100.000 (America Centrale e Meridionale ed Est Europeo) ad aree con incidenza < 25/100.000 (Paesi industrializzati). In Europa i valori più bassi si osservano nei Paesi Occidentali, mentre si raggiungono valori superiori a 100.000 negli Stati dell'ex Unione Sovietica; l'Est Europeo è l'unica parte del nostro Continente dove la Tubercolosi è in crescita. In Italia i valori di incidenza sono stabili da circa 20 anni: i casi notificati si aggirano intorno a 6 per 100.000 abitanti anche se si stima un'incidenza reale superiore di circa il 50%. La mortalità in Italia è diminuita notevolmente negli ultimi 25 anni; questa diminuzione è più spiccata di quella osservata per le malattie infettive nel loro complesso. Tuttavia in Italia si registrano tuttora circa 500 decessi per anno causati dalla Tubercolosi e questi decessi interessano quasi esclusivamente i pazienti ultra sessantacinquenni (20). Il ritorno dell'infezione tubercolare segnalato in diversi paesi industrializzati, compresa l'Italia, è determinato da molteplici cause, spesso interconnesse, in parte di ordine biologico ed in parte sociale (29):

- o Aumento dell'immigrazione da Paesi ad elevata endemia tubercolare
- o Diffusione crescente dell'infezione da HIV
- o Emergenza di ceppi Micobatterici a resistenza multipla
- o Avverse circostanze socio-economiche, relative ad immigrati, homeless...
- o Deterioramento dell'organizzazione anti-tubercolare come lo smantellamento dei Sanatori.

A differenza dei Paesi poveri dove il fenomeno è ovunque grave e generalizzato, nei Paesi sviluppati, l'aumento della Tubercolosi si concentra prevalentemente in minoranze o gruppi di minoranze ben definiti; ciascuno di essi presenta caratteristiche economiche, sociali o ambientali che facilitano il contagio e che, nei malati, favoriscono la comparsa della malattia (25).

La Tabella 1 indica i dati relativi all'incidenza della Tubercolosi (il numero dei nuovi casi insorti ogni anno) e la mortalità in ognuna delle Regioni identificate dall'OMS nel 2002. L'incidenza di tutte le forme di Tubercolosi, l'incidenza dei casi d'infezione (di quelli positivi) e la mortalità sono analizzati in relazione sia al numero di casi sia al tasso di popolazione per 100.000 individui. La maggior parte dei casi si presentano nella regione del sud-est



asiatico, che conta globalmente il 33% di casi. Comunque il numero d'incidenza pro capite nella regione sub-sahariana dell'Africa è quasi il doppio di quello del sud-est asiatico, con i suoi 350 casi per 100.000 individui. Nel 2002 sono stimati 2 milioni di morti a causa della Tubercolosi. Così come i casi della malattia, il più alto numero di morti stimate è della regione del sud-est asiatico, ma il più alto grado di mortalità pro capite è in Africa, dove l'HIV ha condotto al rapido incremento dell'incidenza della Tubercolosi ed all'aumento della probabilità di morire (11).

OMS region	Numero di casi (centinaia)		Casi per 100.000 individui		Morti per TB (incluse le morti di persone affette da HIV)	
	Tutte le forme (%)	Forma positiva	Tutte le forme	Smear- positive	Numero (centinaia)	Per 100.000 individui
Africa	2354 (26)	1000	350	149	556	83
America	370 (4)	165	43	19	53	6
Eastern Mediterranean	622 (7)	279	124	55	143	28
Europa	472 (5)	211	54	24	73	8
Sud-est Asiatico	2890 (33)	1294	182	81	625	39
Western Pacific	2090 (24)	939	122	55	373	22
Global	8797 (100)	3887	141	63	1823	29

**Tabella 1. Stima incidenza Tubercolosi e mortalità 2002.**

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel suo rapporto Global Tuberculosis Control 2005, presentato a Ginevra in occasione della Giornata Mondiale della Tubercolosi, sottolinea come nel continente nero i tassi di incidenza della malattia siano triplicati rispetto al 1990, in particolare nei paesi dove maggiore è la diffusione del virus dell'HIV. La Tubercolosi è sempre più pericolosa in Africa mentre in Europa orientale iniziano a comparire ceppi resistenti ai farmaci. Al contrario, nel resto del Mondo la prevalenza della malattia è calata del 20 per cento dal 1990 ad oggi e l'incidenza, cioè la comparsa di nuovi casi sta scendendo o sta rimanendo stabile, in cinque o sei regioni del Mondo. L'unica eccezione è l'Africa dove l'incidenza della malattia è triplicata e dove, complessivamente, ogni anno i casi crescono di circa il 3-4%. L'emergenza è alta anche nei paesi "virtuosi" del continente nero, quel-

li, cioè, dove l'Aids sta riducendo le sue vittime, come l'Uganda. Qui i malati di Tbc che accedono alle cure sono meno della metà. I passi in avanti maggiori nella lotta contro la Tbc sono stati fatti in Cina ed in India; altri paesi si stanno incamminando sulla stessa strada, come l'Indonesia e le Filippine. Globalmente, i malati trattati con i farmaci sono aumentati dell'8% nel corso del 2003. Secondo l'OMS, questi dati fanno sperare che l'obiettivo di ridurre l'incidenza della malattia possa essere raggiunto in gran parte del pianeta entro il 2015. Rimarrà fuori l'Africa e a sorpresa l'Europa, dove, in particolare nei paesi dell'Ex Unione Sovietica, stanno diffondendosi ceppi resistenti ai farmaci. Il Direttore Generale dell'Oms, LEE Jong-wook, ha commentato così il rapporto: "questi dati autorizzano all'ottimismo, perchè mostrano che la Tubercolosi può essere sconfitta; ma è anche un chiaro allarme. Come ha detto Nelson Mandela, non possiamo battere l'Aids senza combattere la Tubercolosi. Ed è giunto il momento per l'Africa di combinare le due lotte, urgentemente, per debellare le due epidemie". Per questo la multinazionale GlaxoSmithKline e l'associazione no profit Global Alliance for TB Drug Development hanno annunciato di aver raggiunto un accordo per lo sviluppo di nuovi medicinali in grado di combattere contro questi ceppi resistenti (30).

Fondamentale è realizzare efficaci programmi di prevenzione e di controllo della Tubercolosi. A tal fine, la diagnosi precoce acquista, senza dubbio, una grande importanza clinica ed epidemiologica. Il Laboratorio di Micobatteriologia assume un ruolo insostituibile nel controllo della malattia, attraverso l'isolamento rapido, l'identificazione ed il test di sensibilità dei ceppi di *M.tuberculosis* (25).

## Classificazione e caratteristiche dei Micobatteri

I Micobatteri appartengono al genere *Mycobacterium* (dal greco μυκηζ: micete e βακτηριου: bastoncino), ordine *Actinomycetaceae*, classe *Schizomycetae*; famiglia *Mycobacteriaceae*. Il genere comprende parassiti obbligati, saprofiti e forme intermedie (62). Tra le specie Micobatteriche di maggior interesse clinico si annoverano (2):

- *M.tuberculosis*, *M.bovis* e *M.africanum*, responsabili delle affezioni tubercolari nell'uomo, L'agente eziologico della Tubercolosi è il *M.tuberculosis*, ma forme tubercolari possono essere causate anche da *M.bovis* ed in alcuni Paesi africani, da *M.africanum*
- *M.leprae*
- Il gruppo dei Micobatteri non tubercolari (MOTT: *Mycobacteria Other*)

Than Tubercle bacilli) comprendente sia specie patogene per l'uomo che specie saprofiti.

Le più rappresentative specie Micobatteriche, tubercolari e non, sono elencate in Tabella 2.

Gruppo	Potenzialmente patogeni Specie	Normalmente non patogeni Specie
<i>M.tuberculosis</i> complex (MTC)	<i>M.tuberculosis</i> <i>M.bovis</i>	<i>M.bovis</i> BCG *(Bacillo di Calmette e Guérin)
Micobatteri non tubercolari (MOTT)	<i>M.africanum</i> <i>M.kansasii</i> <i>M.marinum</i> <i>M.simiae</i> <i>M.asiaticum</i> <i>M.scrofulaceum</i> <i>M.szulgai</i> <i>M.xenopi</i> <i>M.avium</i> <i>M.intracellulare</i> <i>M.ulcerans</i> <i>M.malmoense</i> <i>M.haemophilum</i> <i>M.fortuitum</i> <i>M.chelonae</i> : - <i>subsp.chelonae</i> - <i>subsp.abscessus</i> <i>M.paratuberculosis</i> <i>M.leprae</i> <i>M.lepraemurium</i>	<i>M.gordonae</i> <i>M.flavescens</i> <i>M.gastri</i> <i>M.nonchromogenicum</i> <i>M.terrae</i> <i>M.triviale</i> <i>M.phlei</i> <i>M.smegmatis</i> <i>M.vaccae</i> <i>M.parafortuitum</i>

**Tabella 2. Classificazione dei Micobatteri.** (da Barbuti S. et al.,1995).

Le colonie di Micobatteri possono presentare una pigmentazione di colore variabile dal giallo all'arancione intenso, dovuta alla produzione di cristalli di carotene; le specie che possiedono questa proprietà si distinguono in: "fotocromogene" (per le quali la formazione di pigmento richiede la luce) e "scotocromogene" (per le quali il pigmento si forma sia alla luce che al buio). Esistono anche specie nelle quali la pigmentazione è assente o sporadica e sono definite "non cromogene" (5).

Nel 1959 E. Runyon propose una classificazione che, in base alla cromogenia ed alla velocità di crescita a 37°C, divideva le specie Micobatteriche in

quattro gruppi: specie fotocromogene a lenta crescita (gruppo I), specie scotocromogene a lenta crescita (gruppo II), specie non cromogene a lenta crescita (gruppo III), specie pigmentate e non a crescita rapida (gruppo IV). Questa classificazione non è netta, in quanto, alcune specie possono appartenere a più gruppi contemporaneamente e conserva, ormai, solo un valore storico (31).

Le diverse specie Micobatteriche, in base alle loro somiglianze bio-fisiologiche, sono riunite in gruppi denominati “complessi”, che prendono il nome dalla specie più rappresentativa.

Alcuni esempi (31):

- *M.tuberculosis* complex (MTC), che comprende: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.bovis* BCG, *M.microti*
- *M.avium* complex (MAC), che comprende: *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.xenopi*
- *M.scrofulaceum* complex, che comprende: *M.scrofulaceum*, *M.simile*
- *M.gordonae* complex, che comprende: *M.gordonae*, *M.szulgai*
- *M.kansasii* complex, che comprende: *M.kansasii*, *M.gastri*
- *M.terrae* complex, che comprende: *M.terrae*, *M.nonchromogenicum*, *M.triviale*
- *M.fortuitum* complex, che comprende: *M.fortuitum*, *M.chelonae*
- *M.parafortuitum* complex, che comprende: *M.parafortuitum*, *M.vaccae*

I Micobatteri sono bacilli sottili e dritti o leggermente incurvati, delle dimensioni circa di 0.2-0.6 x 1.0-10 µm; immobili, asporigeni, aerobi e privi di capsula. In linea generale, sono pleomorfi e durante la crescita possono mostrare ramificazioni o formazione di filamenti; contrariamente agli attinomiceti, i filamenti dei Micobatteri, se disturbati, possono frammentarsi e dare origine ad elementi bastoncellari o coccoidi; in nessun caso, però, si ha formazione di un vero e proprio micelio (5).

I Micobatteri producono una vasta gamma di lipidi. L'elevato contenuto lipidico è responsabile di alcune caratteristiche peculiari del genere:

- o La parete cellulare dei Micobatteri contiene un peptidoglicano legato covalentemente ad un polimero arabinoso-galattoso-acido micolico, questo complesso peptidoglicano-polisaccaride-lipide, conferisce carattere idrofobico alla superficie cellulare dei Micobatteri (5)
- o I Micobatteri presentano una debole colorazione con il metodo di Gram; la consistente componente lipidica della parete cellulare rende difficoltosa la penetrazione del colorante, che viene trattenuto debolmente ed in maniera irregolare. Comunque, vengono considerati Gram positivi in base alla struttura morfologica fine della parete cellulare (31)

- o La presenza, nella parete batterica, degli acidi micolici, consente la colorazione selettiva di tutti gli organismi appartenenti al genere *Mycobacterium*, mediante la colorazione per acido-resistenza. Questa speciale caratteristica fu scoperta da Robert Kock durante i suoi studi pionieristici sulla Tubercolosi
- o In generale i Micobatteri possono essere suddivisi in due gruppi principali: “a crescita lenta” (si osservano colonie dopo, almeno, sette giorni) e “a crescita rapida” (si osservano colonie in meno di sette giorni), come riportato nella Tabella 3.

Specie	Patogenicità per l'uomo
<b>Specie a crescita lenta</b>	
<i>M.tuberculosis</i>	+
<i>M.africanum</i>	+
<i>M.bovis</i>	+
<i>M.intracellulare</i>	+
<i>M.avium</i>	+
<i>M.kansasii</i>	+
<b>Specie a crescita rapida</b>	
<i>M.chelonae</i> :	
- subsp <i>chelonae</i>	
- subsp. <i>abscessus</i>	+
<i>M.smegmatis</i>	-
<i>M.phlei</i>	-
<i>M.parafortuitum</i>	-

**Tabella 3. Patogenicità di alcune specie rappresentative di Micobatteri.** (da Brock T.D. et al., 1996).

Presumibilmente la crescita lenta di molte specie Micobatteriche è, almeno in parte, conseguenza della natura idrofobica della loro superficie cellulare, che rende le cellule piuttosto impermeabili ai nutrienti (le specie con un contenuto di lipidi inferiore crescono, infatti, più velocemente). *M.tuberculosis* è un tipico esempio di Micobatterio a crescita lenta: dall'inoculo, le colonie sono visibili solo dopo settimane di incubazione

- o I Micobatteri, quando crescono su terreni solidi, formano in genere colonie molto compatte, spesso rugose e ciò avviene perché le cellule del microrganismo tendono ad ammassarsi. Tale caratteristica morfo-logia di colonia è probabilmente riconducibile all'elevato contenuto lipidico ed alla natura idrofobica della superficie delle cellule (5).

**M.tuberculosis** è la specie più rappresentativa del genere *Mycobacterium*, responsabile della maggior parte delle infezioni tubercolari nell'uomo.

Il tempo di riproduzione *in vitro*, in condizioni ottimali, è di 14-15 ore. La temperatura ottimale di crescita è 37°C, il pH 6.4-7.0; la crescita è stimolata dall'incubazione in atmosfera addizionata al 5-10% di CO<sub>2</sub> (58). Nei materiali organici si presenta isolato o a coppie, con disposizione a L o a V oppure in piccoli ammassi, simili a cordoni, nei quali i bacilli mostrano un orientamento parallelo.

*M.tuberculosis* ha una struttura complessa, costituita da (2):

- Proteine, tra cui frazioni esoproteiche responsabili delle reazioni di ipersensibilità ritardata
- Lipidi (30-40% in peso secco dell'intero corpo batterico), che comprendono:
  - o fosfolipidi: responsabili della reazione granulomatosa tissutale con formazione del tubercolo e necrosi caseosa
  - o cere: contenenti acidi micolici con lunghe catene ramificate (60-90 atomi di C)
- Complessi polisaccaridici che fungono da antigeni ed inducono la comparsa di anticorpi circolanti.

*M.tuberculosis* non produce tossine ed i processi della malattia sono soprattutto il risultato di reazioni di ipersensibilità ritardata verso gli antigeni Micobatterici. L'azione patogena sembra imputabile ad una tossicità intrinseca, legata ad alcuni dei numerosi lipidi della parete cellulare: alcuni glicolipidi, e certi sulfolipidi (8).

La virulenza di *M.tuberculosis* è stata correlata alla formazione di strutture dall'aspetto di lunghi cordoni (sia in terreno liquido che solido), costituite da catenelle di batteri, aggregate lungo i lati ed intrecciate tra loro; questo particolare tipo di accrescimento è riconducibile alla presenza sulla superficie cellulare di un glicolipide caratteristico: il 6,6-dimicoliltrealosio, denominato "cord factor" (5).

*M.tuberculosis* è un bacillo assai resistente agli agenti fisici e chimici, naturali ed artificiali; si può considerare il più resistente tra i batteri patogeni non sporigeni. Sopravvive a lungo, anche per molti mesi, nell'ambiente esterno all'essiccamento specialmente se contenuto in materiale organico ed al riparo dalla luce. Resiste al calore secco a 100°C per 2 ore, a lungo nelle soluzioni acide ed alcaline. E' inattivato in poche ore dalla luce solare diretta, in 30 minuti dal calore umido a 60°C, in 4 ore dalla formalina al 3% e dal cresolo all'1% ed in pochi minuti dalla tintura di iodio.

La causa della resistenza di *M.tuberculosis* a trattamenti prolungati con agenti chimici come alcali e fenoli sembra essere l'elevato contenuto di lipidi nella parete cellulare; tale proprietà è sfruttata per isolare il microrganismo da materiali fortemente contaminati (2).

## **M.africanum**

*Mycobacterium africanum* è una varietà di Micobatteri tubercolari individuata - da qualche decennio - in alcune forme di TB polmonare ed extrapolmonare verificatesi in Paesi africani (Sudan, Kenia, Nigeria, Ghana, Sierra Leone). Segnalazioni sono pervenute anche dalla Francia, ove le caratteristiche microbiologiche del ceppo sono state studiate presso l'Istituto Pasteur.

Trattasi di una specie microbica a lento accrescimento, con caratteristiche metaboliche e culturali intermedie tra il Micobatterio umano e quello bovino. In Italia non risultano segnalazioni in proposito.

## **M.bovis**

*Mycobacterium bovis*: un'accurata analisi epidemiologica (1995), condotta su scala mondiale da Reilly e Daborn, riconosce alla TB umana da Micobatteri bovini una frequenza dello 0,6-0,2%. Le più alte percentuali concernono Paesi ad alta concentrazione di allevamenti di bestiame (Inghilterra, Olanda, Argentina, Australia). In Svizzera le norme di bonifica adottate sugli animali infetti hanno ridotto considerevolmente il rischio che, in passato, era molto elevato. In realtà un esatto accertamento è di difficile attuazione poiché la similarità delle manifestazioni cliniche non sempre sollecita indagini discriminative tra la varietà umana e quella bovina.

Peraltro esistono numerose osservazioni su forme polmonari ed extra polmonari (adenopatie, meningiti) dovute a Micobatteri bovini attraverso contagi interumani o, più spesso, attraverso prodotti contaminati (latte, latticini freschi) provenienti da bestiame infetto.

Possibile dipendenza da infezioni da Micobatterio bovino sono, non di rado, alcuni complessi primari del cavo orale (con adenopatia satellite latero cervicale) ed alcuni complessi primari del tratto ileo-cecale.

## **Micobatteri atipici o non tubercolari**

Micobatteri atipici o non tubercolari (MOTT. myc. other than tuberc.): costituiscono una categoria molto estesa di Micobatteri il cui carattere ubiquitario ne comporta la possibile presenza nell'aria ambiente, nel terreno, nelle acque ed in alcuni animali (domestici e non) ove si mantengono allo stato saprofitico.

Ne è segnalata anche la presenza sulle pareti delle piscine, negli acquari domestici, nei condizionatori d'aria.



Il contatto può pertanto avvenire per via aerogena, per via digestiva (alimenti inquinati), per diretto contatto sulla cute. E' inoltre possibile la trasmissione interumana da individuo portatore o malato ad individuo sano.

Sono più di 50 le specie "atipiche" sinora individuate e non è agevole stabilirne la collocazione tassonomica; tuttavia solo alcune (tra cui avium/intracellulare, kansasii, xenopi, scrofulaceum) possono determinare nell'uomo malattia polmonare o extrapolmonare.

La loro incidenza non è di facile quantificazione (in Italia rappresentano il 2-7% di tutte le forme Micobatteriche); essa è, d'altronde, variabile nelle diverse aree geografiche del mondo (14).

## Sorgenti di infezione e modalità di trasmissione

La fonte principale di infezione tubercolare è l'uomo: il malato elimina i bacilli per via aerea e, molto più raramente, attraverso le feci (Tubercolosi intestinale), le urine (Tubercolosi renale) ed eccezionalmente per altre vie (cutanea, genitale).

Le modalità di diffusione dei Micobatteri riguardano la trasmissione germe-uomo e germe-ambiente. Il contagio interumano si verifica nel caso dei Micobatteri appartenenti al *M.tuberculosis* complex, ma non nei Micobatteri non tubercolari (23) (Tabella 4).

La via di penetrazione principale è quella inalatoria o aerogena, che si realizza in oltre il 95% dei casi. I bacilli, eliminati dal malato, con la tosse e la fonazione, vengono inalati direttamente con le goccioline di Flügge o con il pulviscolo atmosferico, dopo essersi depositati su materiale ambientale vario (suppellettili, polvere). I dati epidemiologici indicano che, di solito, per avviare l'infezione nell'uomo, sono necessarie elevate dosi o un'esposizione prolungata, a dosi infettanti minori (2).

	<b>Tipo di contagio</b>
<b><i>M.tuberculosis</i> complex (MTC)</b>	Interumano Animale-uomo Ambiente-uomo
<b>Micobatteri non tubercolari (MOTT)</b>	Ambiente-uomo Animale-uomo

**Tabella 4. Vie di trasmissione dei Micobatteri. (da Lacchini C., 1999).**

Altre vie di infezione tubercolare, meno frequenti, sono (20):

- Via orale (enterogena), per ingestione dei prodotti di animali infetti (latte e suoi derivati)
- Via aero-enterogena, secondo la quale, i Micobatteri, deglutiti, passerebbero dall'intestino al sangue
- Via aero-linfo-ematogena, per la quale, Micobatteri fermatisi nel tessuto linfatico, in particolare nelle tonsille, arriverebbero al polmone per via ematica o linfo-ematica
- Via cutanea, attraverso lesioni cutanee esposte a materiale infetto
- Via mucosa (molto rara), tramite la congiuntiva oculare e le mucose genitali
- Infezione tubercolare congenita che prevede il passaggio attraverso la placenta lesionata, di Micobatteri; questi, attraverso la vena ombelicale, raggiungono il fegato del feto.

Nonostante la localizzazione di *M.tuberculosis* sia prevalentemente polmonare, esso può infettare qualsiasi organo ed apparato. Tra le localizzazioni extrapolmonari, la più frequente è quella pleurica, seguita da quella cutanea, linfonodale, dell'apparato urinari (2).

## Patogenesi ed immunità

La Tubercolosi è una malattia infettiva caratterizzata da una complessa patogenesi, quadri clinici variabili e particolari meccanismi immunitari (2).

I principali stadi della storia naturale della Tubercolosi sono (28):

- 1) Esposizione ad un soggetto con Tubercolosi
- 2) Infezione tubercolare
- 3) Malattia tubercolare: in media solo il 10% dei soggetti infetti progredisce verso la malattia (5% nei primi due anni e 5% nel successivo corso della vita)
- 4) Decesso per Tubercolosi.

I fattori di rischio, associati ad un aumento della probabilità di passare da uno stadio all'altro, sono presentati in Tabella 5.

Generalmente la prima infezione tubercolare avviene per via aerea o inalatoria. Il bacillo penetra direttamente attraverso l'albero respiratorio, localizzandosi nei lobi polmonari, per lo più in corrispondenza delle zone basali e sottopleuriche e raggiunge le estreme ramificazioni bronchiolo-alveolari, dopo aver superato sia le difese organiche di tipo meccanico (muco e ciglia),

	<b>Fattori di rischio</b>
ESPOSIZIONE	- incidenza casi contagiosi
INFEZIONE	- possibili contatti - quantità di particelle infette sospese in aria - ricambi d'aria
MALATTIA	- durata dell'esposizione - resistenza individuale
DECESSO	- funzionalità del sistema immunitario - localizzazione e forma clinica - età - ritardo diagnostico e/o terapeutico

**Tabella 5. Storia naturale della Tubercolosi e fattori di rischio.** (da Moro M.L., 1995).

che quelle di tipo immunitario; qui provoca un processo flogistico di tipo essudativo-necrotico con la formazione del tipico essudato caseoso. I bacilli vengono inglobati dai macrofagi, quelli che sopravvivono, continuano a moltiplicarsi al loro interno e vengono trasportati ai linfonodi che drenano la zona infetta; vi è adenopatia con interessamento dei linfonodi delle stazioni satelliti (ilo-mediastiniche, sopra-claveari). L'insieme di queste lesioni costituisce il *complesso primario* (2).

Le lesioni necrotiche associate al complesso primario possono, talvolta, intaccare l'integrità dei vasi sanguigni e/o linfatici, portando i Micobatteri in circolo, con successiva localizzazione metastatica in varie sedi: ossa, articolazioni, meningi, apparato urogenitale, reni, ... Si parla in questi casi di *Tubercolosi miliare* (dal latino *milium*: grano di miglio, per via delle dimensioni delle lesioni riscontrate negli organi colpiti). Le localizzazioni extrapolmonari sono, quasi sempre, il risultato di una disseminazione attraverso la circolazione sanguigna o linfatica, a partire da un focolaio polmonare (30).

Nella grande maggioranza dei casi, la Tubercolosi primaria decorre in modo paucisintomatico: la moltiplicazione dei Micobatteri avviene relativamente senza ostacoli; la reazione infiammatoria è scarsa, aspecifica, i segni dell'infezione sono assenti o simili a quelli di una lieve sindrome influenzale. Alcune settimane (2-6), dopo la prima infezione tubercolare, si sviluppano sia complessi meccanismi immunitari cellulo-mediati, che uno stato di ipersensibilità di tipo ritardato (tipo IV), verso il bacillo tubercolare, con formazione di tipici tubercoli nella zona di moltiplicazione bacillare. I granulomi tubercolari o tubercoli sono noduli di tessuto infiammatorio, che rappresentano una forma cronica di ipersensibilità di tipo ritardato, in risposta alla persistenza dei Micobatteri. I tubercoli sono costituiti da cellule epitelioidi (macrofagi modificati), disposte concentricamente attorno ai focolai d'infe-

zione (zona di necrosi caseosa), da cellule giganti polinucleate di Langherans e da infiltrati linfocitari in posizione più esterna; in periferia si riscontra una reazione fibroblastica che circonda e delimita il granuloma (8).

L'evoluzione della prima lesione tubercolare, nel soggetto immunocompetente, è di norma verso la guarigione e, comunque, è in rapporto con diversi fattori quali (2):

- o La virulenza dello stipoite e la sua carica infettante
- o Particolari condizioni organiche predisponenti dell'ospite: fattori ereditari, costituzionali ed ambientali, condizioni di vita e di lavoro, condizioni fisiologiche (quali la gravidanza), malattie infettive concomitanti.

Solo in casi estremi, l'infezione primaria progredisce, portando alla morte del soggetto infettato. Tuttavia la patologia tubercolare è legata, soprattutto, alle reinfezioni in soggetti precedentemente sensibilizzati; reinfezioni che possono essere:

- o Esogene: per introduzione di una nuova carica batterica
- o Endogene: per attivazione e mobilizzazione di bacilli sopravvissuti nel focolaio primario o linfonodale, a seguito di una caduta delle difese immunitarie (reinfezione endogena post-primaria). In caso di HIV, il rischio di riattivazione di infezione tubercolare latente, aumenta del 23% rispetto all'ospite immunocompetente.

L'acquisizione dello stato di ipersensibilità viene verificata con le prove tubercoliniche che consistono nell'impiego di sostanze costituenti il corpo batterico (tubercoline); la preparazione comunemente usata è il PPD (Purified Protein Derivative), una frazione proteica complessa altamente purificata a basso peso molecolare (p.m.) (2).

L'uomo possiede, di solito, un'immunità innata abbastanza elevata contro lo sviluppo della malattia. Ci sono eccellenti prove epidemiologiche e storiche delle differenze dell'immunità razziale. Le razze con una lunga storia di urbanizzazione ed esposizione alle epidemie del XVII e del XIX secolo, hanno una resistenza maggiore delle popolazioni rurali o di quelle la cui esposizione all'infezione è piuttosto recente. Le popolazioni di origine europea urbanizzate sembrano avere un alto grado di immunità, mentre gli indiani americani e gli eschimesi, la cui esposizione è abbastanza recente, sono molto sensibili ed all'insorgere dell'infezione mostrarono alta morbosità e mortalità. È impossibile essere precisi sulla portata che l'incidenza delle differenze nell'immunità innata abbia avuto sulla morbosità e sulla mortalità, poiché intervengono anche differenze culturali ed ambientali.

## Test tubercolinici

I test tubercolinici sono di notevole importanza in campo epidemiologico, per rilevare l'entità dell'endemia tubercolare in una popolazione (indici tubercolinici); inoltre sono molto utili nella profilassi immunitaria della malattia, per selezionare i soggetti da sottoporre a vaccinazione e per controllare l'efficacia di quest'ultima (2).

In Italia, oggi, si utilizzano due tipi di test:

1. Mantoux
2. Test multipuntura

Entrambi utilizzano la tubercolina in infiltrazione intradermica sotto forma di PPD (Purified Protein Derivative), che è un precipitato proteico filtrato da colture di *M.tuberculosis* sterilizzate.

### Test di Mantoux

L'intradermoreazione di Mantoux è il metodo più classico, sensibile e presenta il vantaggio di poter introdurre una quantità definita (0,1 ml di soluzione tubercolinica, contenente 5 UI, cioè, Unità tubercoliniche Internazionali di PPD). La tubercolina viene iniettata con una siringa ad ago sottile subito sotto lo strato superficiale della cute del braccio. E' un esame innocuo, effettuabile sui bambini, sulle donne gravide e sui soggetti immunodepressi. (pneumonet). La lettura viene effettuata dopo 48-72 ore. Se c'è stata una reazione, si osserverà un'area di eritema (arrossamento) e di indurimento della cute, riconoscibile al tatto, come un'area cutanea più dura.

La positività viene registrata in millimetri, misurando con precisione il diametro trasverso dell'indurimento. In assenza di fattori di rischio, si considerano positive le cutireazioni di diametro  $\geq 10$  mm. La Mantoux è sicuramente il test da preferire per gli screening periodici, ripetuti sugli stessi soggetti (Insegnanti, Operatori sanitari, ...) e trova indicazione assoluta negli screening di gruppi a rischio di sviluppare la Tubercolosi. In questi ultimi, una volta accertata l'assenza di malattia attiva, con la radiografia del torace, il risultato della Mantoux, oltre che identificare gli infetti, consente di decidere in quali soggetti si dovrà iniziare la chemioprolassi, a seconda del gruppo a rischio di appartenenza (40). In Tabella 6 sono riportate le categorie dei soggetti da sottoporre a chemioprolassi, in base al risultato della Mantoux.

Risultato della Mantoux	Gruppi a rischio
≥ 5 mm	<ul style="list-style-type: none"><li>- soggetti HIV positivi</li><li>- Contatti recenti di casi di TBC polmonare</li><li>- soggetti con esiti fibrotici all'RX del torace</li></ul>
≥ 10 mm (tutte le età)	<ul style="list-style-type: none"><li>- soggetti con patologie favorenti (immunodepressione, diabete, silicosi,...)</li><li>- Tossicodipendenti HIV negativi</li></ul>
≥ 10 mm (soggetti con meno di 35 anni di età)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Immigrati da paesi ad alta endemia tubercolare</li><li>- Carcerati</li><li>- Istituzionalizzati (degenti cronici, pazienti psichiatrici)</li></ul>
≥ 15 mm (soggetti con meno di 35 anni di età)	<ul style="list-style-type: none"><li>- soggetti senza fissa dimora</li><li>- soggetti non appartenenti a nessuno dei gruppi a rischio sopramenzionati</li></ul>

**Tabella 6. Risultato della Mantoux e gruppi da sottoporre a chemioprophilassi.** (da Salamina G., 1995).

### **Test multipuntura**

Sono dispositivi dotati di punte che, premute sulla cute, permettono il passaggio della PPD secca (Tine-test) o liquida (Monotest), all'interno del derma. Anche in questo caso, la lettura viene effettuata dopo 48-72 ore e, in caso di positività, si osserva la presenza sulla cute di papule più o meno confluenti. I test multipuntura sono sicuramente di più semplice esecuzione, ma la quantità di antigene iniettato è variabile e non può essere misurata con esattezza, compromettendo la riproducibilità del test da un soggetto all'altro. Inoltre, date le caratteristiche della cutireazione al test multipuntura, la lettura quantitativa del risultato e la determinazione precisa di soglie di positività sono decisamente meno accurate che nella Mantoux. I test multipuntura sono comunque accettabili per gli screening eseguiti a fini epidemiologici, ma la loro esecuzione deve essere standardizzata e la lettura eseguita con una soglia di positività ben definita:  $\geq 2$  mm per il Tine-test e  $\geq 3$  mm per il Monotest (40).

## Nuovi strumenti per la diagnosi di Tubercolosi

Il test cutaneo tubercolinico, pur essendo a tutt'oggi il test di riferimento per la diagnosi di infezione tubercolare, presenta numerosi limiti. In primo luogo è un esame eseguito *in vivo*, che necessita di una visita di ritorno per la lettura del risultato. In secondo luogo, sia l'inoculazione che la lettura del test sono operatore-dipendente ed entrambe affette da una notevole variabilità. Inoltre, la cross-reattività antigenica esistente tra PPD, BCG e Micobatteri non tubercolari è responsabile di una certa quota di falsi positivi all'intradermo-reazione di Mantoux.

Molti soggetti immigrati da aree ad elevata prevalenza tubercolare, per esempio, sono anche BCG vaccinati, pertanto l'utilizzo del solo test cutaneo tubercolinico per la diagnosi di infezione tubercolare latente pone seri problemi nell'identificazione di coloro che sono effettivamente portatori di un'infezione tubercolare latente e quindi candidati alla chemioprolifassi. Infine, in alcuni gruppi di soggetti potenzialmente a maggior rischio di sviluppare una TB attiva a seguito di riattivazione di infezione latente, quali per esempio i pazienti immunodepressi, il test cutaneo tubercolinico può essere più spesso falsamente negativo.

Sulla base delle esposte considerazioni e sulla scorta delle recenti acquisizioni di biologia molecolare riguardanti il MTB, negli ultimi anni si è cercato di sviluppare nuovi strumenti per la diagnosi di infezione tubercolare latente. Attualmente sono disponibili due nuovi test accomunati da alcuni principi fondamentali, che li differenziano in maniera sostanziale rispetto al test cutaneo tubercolinico.

Innanzitutto, si tratta di test *ex vivo*, eseguiti su campioni di sangue venoso periferico, per cui non necessitano di una visita di ritorno. Inoltre utilizzano come stimolo antigenico le proteine ESAT-6 e CFP-10, cioè due prodotti genici del gene RD1; questo gene non è presente nel bacillo di Calmette-Guerin (BCG) né nella maggior parte dei Micobatteri non tubercolari, per cui non determina fenomeni di cross-reattività e quindi di ridotta specificità; ciò che rende questi test maggiormente specifici rispetto al test cutaneo tubercolinico.

Entrambe le metodiche infine rilevano, anche se con tecniche differenti, la produzione di IFN- (la principale citochina della risposta immune a MTB) da parte di linfociti T in risposta ai suddetti antigeni MTB-specifici; pertanto essi non risentono dell'effetto di potenziamento (*booster*) causato da precedenti test cutanei e quindi possono essere eseguiti anche a breve distanza di tempo.

In virtù di tali caratteristiche potrebbero migliorare l'efficacia della diagnosi e del trattamento dell'infezione tubercolare latente, apportando un decisivo contributo per raggiungere l'obiettivo dell'eliminazione della tubercolosi dai Paesi industrializzati a bassa prevalenza di malattia (14).

Tale test, sulla base dei riscontri della bibliografia internazionale, viene



segnalato anche per aprire nuove opportunità investigative nella fase attiva di malattia (12). È stato valutato dall'Unità Operativa di Microbiologia dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma su un campione rappresentativo della popolazione pediatrica ed i risultati evidenziano che il test è un valido ausilio alla diagnosi di infezione tubercolare latente/infezione tubercolare attiva. In considerazione della rara possibilità di cross-reazione con altre specie del genere *Mycobacterium* potrebbe essere anche utilizzato negli accertamenti di controllo per patologie respiratorie croniche "non specifiche" (42).

### **Uso dei nuovi test per la diagnosi di Infezione Tubercolare latente**

L'identificazione dei soggetti con infezione tubercolare latente, nei quali è utile intraprendere una chemiopprofilassi per prevenire lo sviluppo in futuro di una TB attiva, costituisce uno dei principali interventi ai fini del contenimento della diffusione della malattia. La diagnosi di infezione tubercolare latente per definizione è una diagnosi di esclusione che si basa sull'assenza di segni di malattia attiva in un soggetto che presenta un test cutaneo tubercolinico positivo, pur con i limiti dello stesso.

La prima dimostrazione clinica della validità della tecnologia su cui si basa uno di questi test deriva dallo studio di Mazurek e collaboratori i quali hanno dimostrato, su una popolazione di 1.226 soggetti adulti, che questo test (in questo caso utilizzato con PPD come antigene) presenta un elevato livello di concordanza con il test Mantoux (oltre l'80%). Nel 2001 lo stesso test è stato approvato negli Stati Uniti dalla *Food and Drug Administration* (FDA) quale ausilio per la diagnosi di infezione tubercolare latente. Secondo le linee guida dei CDC, le principali indicazioni all'esecuzione di questo test sono: la valutazione di persone con un aumentato rischio di infezione tubercolare latente (soggetti recentemente immigrati, tossicodipendenti che utilizzano sostanze stupefacenti per via endovenosa, detenuti ed impiegati di Istituti carcerari); la valutazione di persone a basso rischio di infezione tubercolare latente, ma che in futuro possono presentare un aumentato rischio come gli operatori sanitari; la valutazione di persone a basso rischio, per le quali lo screening dell'infezione tubercolare latente sia eseguito, per esempio, come requisito per l'ammissione a scuole o per posti di lavoro.

### **Uso dei nuovi test per la diagnosi di Infezione Tubercolare attiva**

Al momento non esistono indicazioni per raccomandare l'utilizzo di questi test per la diagnosi di TB attiva. Infatti, lo stato di malattia attiva è asso-

ciato ad una ridotta produzione di IFN- $\gamma$  ed il livello di soppressione sembra essere correlato alla gravità della malattia ed alla durata della terapia. E' stato dimostrato che la percentuale di risposte positive a questi test, tra i pazienti con TB attiva dimostrata microbiologicamente, è superiore rispetto a quella del test cutaneo tubercolinico e che questo dato è indipendente dalla positività o meno dell'esame microbiologico diretto dell'espettorato.

Un'ulteriore conferma di questo dato è venuta, per uno dei test, dall'utilizzo clinico dello stesso in pazienti in terapia immunosoppressiva, infatti, in soggetti in cui il test cutaneo tubercolinico risulta spesso negativo, la positività del test T Spot®-TB può essere determinante per porre il sospetto di infezione tubercolare e quindi per guidare le successive indagini alla ricerca di un'eventuale TB attiva. Recentemente, l'applicazione del test ad un contatto affetto da immunodepressione di caso di TB multi-resistente, ha consentito di porre una diagnosi di malattia attiva in una fase pre-clinica asintomatica, in presenza di un test cutaneo tubercolinico reso negativo dalla concomitante terapia immunosoppressiva.

Un altro studio recente ha dimostrato che uno dei test ha una buona sensibilità e specificità in pazienti con TB attiva in terapia antitubercolare da meno di una settimana. Occorre peraltro ricordare che, sebbene presenti alcuni vantaggi rispetto al test cutaneo tubercolinico sia in termini operativi, sia in termini di sensibilità e specificità, la diagnosi di malattia attiva si basa principalmente sugli esami microbiologici e sulla clinica, per cui tali test hanno un ruolo "di supporto", ma non di conferma di TB attiva. Infine, è importante tenere presente che il test cutaneo tubercolinico e quelli in oggetto non misurano lo stesso elemento della risposta immunologica e quindi non possono essere considerati quali test che si escludano a vicenda. In seguito alla mancanza di dati epidemiologici longitudinali sul rischio di malattia in soggetti testati con i soli metodi immunologici, la loro associazione al tradizionale test tubercolinico è al momento ancora sconsigliata. La Tabella 7 confronta le caratteristiche del test cutaneo con quelle dei nuovi test diagnostici.

## Epidemiologia

La Tubercolosi è una malattia diffusa in tutto il mondo, seppure con incidenze fortemente variabili nelle diverse aree (oltre l'80% dei casi e dei decessi si verificano nei Paesi in via di sviluppo).

Lo stato di endemia tubercolare in un'area geografica viene accertata attraverso la determinazione degli indici tubercolinici, che rappresentano il parametro epidemiologico più attendibile. Ciò consiste nel rilevare la fre-

	Test cutaneo tubercolinico	Nuovi test diagnostici
Esecuzione	<i>In vivo</i>	<i>in vitro</i>
Visita di ritorno	SI	NO
Cross-reattività		
- BCG	SI	NO
- MOTT	SI	NO
Effetto booster	SI	NO
Tipo di Antigeni	PPD	ESAT-6 e CFP-10
Tipo di risposta	Ipersensibilità ritardata	Produzione di IFN- $\gamma$
Tipo di risultato	Infiltrato cutaneo (diametro in mm)	Concentrazione di IFN / N° di linfociti Antigene-specifici $\gamma$
Sensibilità	A seconda del test:	A seconda del test:
- popolazione generale	75-90%	89-96%
- HIV +	40-60%	0-90%
Specificità		
- popolazione generale	-	0-98%
- HIV +	-	0-92%

**Tabella 7. Test per la diagnosi di Infezione Tubercolare: caratteristiche a confronto.**

*Nota: non esistendo un gold standard per la diagnosi di Infezione Tubercolare Latente, i dati relativi a sensibilità e specificità dei nuovi test immunologici si basano su studi condotti in pazienti con TB attiva confermata microbiologicamente.*

quenza di cutipositività (cioè dell'avvenuto complesso primario), in bambini ed adolescenti in età filtro della popolazione scolastica (2).

La Tubercolosi si caratterizza per una curva epidemica che dura secoli, tempo durante il quale si distinguono (21):

1. Una fase *iniziale*: caratterizzata da elevata morbosità (rapidità nel contrarre l'infezione) e mortalità; è la fase corrispondente alla rapida diffusione in una popolazione vergine
2. Una fase *di transizione*: nella quale la mortalità decresce, ma la morbosità ed il tasso di infezione (determinato dalla cutipositività) sono ancora in aumento
3. Una fase *endemica*: con riduzione della mortalità, della morbosità, del tasso di infezione e con spostamento dell'età della prima infezione dall'infanzia all'età adulta.

Secondo i dati dell'OMS, l'infezione tubercolare è riscontrabile in un terzo della popolazione mondiale, circa 1.5 miliardi di Persone PPD positive e, ogni anno, si registrano oltre 10 milioni di nuovi casi, con circa 3 milioni di decessi, più della somma dei decessi causati da tutte le altre malattie infetti-

ve: la Tubercolosi rappresenta la prima causa di morte per infezione nel mondo (16).

Certamente assai meno rilevante è l'incidenza delle patologie non tubercolari, cioè, delle Micobatteriosi, anche se stanno assumendo notevole importanza eziologica, per il tumultuoso aumento negli ultimi anni, soprattutto, in relazione all'incremento delle patologie che causano immunodepressione. In presenza di immunodeficienza grave, anche le specie Micobatteriche meno virulente acquisiscono la capacità di provocare danni rilevanti (51).

Si presentano per la Tubercolosi nuovi aspetti clinici e diagnostici; i problemi emergenti dell'infezione tubercolare sono (9):

- Aumento dell'incidenza nelle aree dove la morbilità era in declino (es. in Italia)
- Emergenza di Micobatteri multiresistenti (MDR: Multi Drug Resistent)
- Patomorfofosi dell'espressione clinica (la Tubercolosi si presenta con caratteri nuovi in quanto associata anche con altre patologie)
- Emergenza di infezioni da Micobatteri non tubercolari (MOTT: Mycobacteria Other Than Tubercle bacilli).

## **Popolazioni sensibili**

### ***I poveri***

La Tubercolosi ha importanti componenti sociologiche e prospera con l'ignoranza, la povertà, il sovraffollamento e la poca igiene, nonché durante catastrofi sociali dovute a guerra o a depressione economica. In queste condizioni i poveri sono le vittime principali.

Nelle classi sociali economicamente disagiate le preoccupazioni sanitarie, specie se a lungo termine, non possono essere prioritarie, scarsa attenzione viene riservata ai problemi di salute e alla prevenzione delle malattie. Tutto ciò favorisce l'aumento dell'incidenza della Tubercolosi e della frequenza di ceppi multiresistenti (26).

### ***Gli immigrati***

I crescenti flussi migratori da paesi ad alta endemia tubercolare, dove i tassi di cutipositività possono raggiungere il 60% della popolazione, contribuiscono a riaccendere la diffusione dell'infezione tubercolare. Chi emigra da questi Paesi è, spesso, già infettato dal bacillo tubercolare e le difese dell'organismo si possono facilmente ridurre, per lo stile di vita al quale si è costret-

ti nel Paese di arrivo, predisponendo alla comparsa della malattia (reinfezione endogena). Inoltre, lo stato di sovraffollamento, al quale spesso gli immigrati devono adattarsi, rende più facile e massivo il contagio da un malato.

Non solo l'incidenza di TBC negli immigrati è molto più alta che nella popolazione residente ma, talvolta, è anche maggiore rispetto al Paese di provenienza: a dimostrazione che sono le condizioni socio-economiche in cui vivono nel Paese ospite a causare un aumento dei casi d'infezione (26).

### **Gli anziani**

Nei Paesi sviluppati è notevolmente cresciuto il numero di anziani; tra costoro si concentrano soggetti nati in epoche ad elevata prevalenza d'infezione tubercolare, che così presentano, rispetto ai più giovani, un elevato tasso di cutipositività, cioè un maggior rischio di malattia per la persistenza di bacilli vitali, anche se dormienti.

La Tubercolosi negli anziani autosufficienti non istituzionalizzati non è epidemiologicamente pericolosa, mentre negli anziani ricoverati, dove il contagio è molto facile, si ha un più elevato tasso di malattia e frequenti epidemie (26).

### **I malati di AIDS**

L'infezione da HIV esercita una notevole influenza sulla storia naturale della Tubercolosi: riduce le difese cellulo-mediate dell'organismo favorendo la comparsa di Tubercolosi, sia per riattivazione endogena nei soggetti cutipositivi, che a seguito di contagio recente.

Come è noto, nell'infezione da HIV, i linfociti T ed i macrofagi risultano qualitativamente e quantitativamente alterati; pertanto di fronte all'aggressione da parte di *M.tuberculosis*, macrofagi e linfociti infetti non possono offrire un'adeguata protezione con una risposta immunologica efficiente (30). Nel caso di infezione da HIV, la Tubercolosi si manifesta con una clinica atipica, un'espressione radiologica non classica e patologie extrapolmonari frequenti; poiché il sistema immunitario risulta compromesso, l'infezione non può essere contenuta in maniera efficace: non si assiste alla risposta granulomatosa, normalmente attesa, o si ha una formazione anomala del granuloma. In eguale misura la Tubercolosi gioca un ruolo prognosticamente sfavorevole nell'evoluzione della patologia da HIV. Tubercolosi e HIV si potenziano a vicenda, tanto da essere stati denominati: "la coppia maledetta". Molte delle condizioni ambientali e sociali che favoriscono l'infezione da HIV contribuiscono a diffondere la Tubercolosi e viceversa: tossicodipendenza, carcerazio-

ne, sottosviluppo, promiscuità, degrado sociale sono elementi che favoriscono entrambe le infezioni (26).

Sulla totalità della popolazione globale infettata in forma latente da *M.tuberculosis* (circa 1.5 miliardi di persone), 5-6 milioni di individui presentano la coinfezione *M.tuberculosis*-HIV (dei quali il 90% nei paesi in via di sviluppo).

La frequenza di malattia tubercolare nei soggetti con doppia infezione (*M.tuberculosis* e HIV) è oltre 100 volte maggiore che nei soggetti con sola infezione tubercolare. Tra i soggetti HIV positivi o malati di AIDS, inoltre, è stato documentato un elevato rischio di diffusione epidemica nosocomiale della Tubercolosi, spesso causata da ceppi batterici multiresistenti ai comuni farmaci antiMicobatterici (30).

### **Altri gruppi a rischio**

Esistono gruppi i cui fattori di rischio sono, prevalentemente, sanitari. Si tratta di (26):

1. Conviventi di malati contagiosi
2. soggetti affetti da patologie o condizioni che riducono le difese generali o locali, come: diabete mellito, silicosi, epatopatie croniche, insufficienza renale, trapianti d'organo, neoplasie...
3. soggetti con infezione recente ad alto rischio di malattia

Tra quelle sopra descritte, nella Tabella 8, sono riportate le popolazioni maggiormente a rischio d'infezione e/o di malattia.

<b>Gruppi ad alto rischio di infezione</b>	<b>Gruppi ad alto rischio di progressione verso la malattia</b>
- Contatti stretti	- Soggetti con infezione da HIV
- Immigrati da Paesi ad alta endemia	- Soggetti con infezione recente
- Senza fissa dimora, poveri	- Soggetti in condizioni patologiche
- Anziani	- Tossicodipendenti (per via endovenosa)
- Istituzionalizzati	- Soggetti con TBC anamnestica trattata inadeguatamente
- Tossicodipendenti (per via endovenosa)	
- Operatori esposti professionalmente	

**Tabella 8. Categorie ad alto rischio di infezione e/o di malattia tubercolare.**  
(da Moro M.L., 1995).

## Multiresistenza

Nella popolazione Micobatterica di ogni malato, compaiono mutanti resistenti ai farmaci, con una frequenza variabile da farmaco a farmaco e direttamente proporzionale alla carica infettante. Si spiega, così, il fallimento della monoterapia e la necessità della terapia anti Micobatterica combinata.

Le ragioni della crescente multiresistenza sono da ricondurre a diversi fattori fra cui i più importanti sono (53):

- lo smantellamento in Italia, a partire dagli anni Settanta, dei Presidi deputati alla diagnosi ed alla cura della Tubercolosi
- la consuetudine, sempre più frequente, del trattamento ambulatoriale, senza verifica diretta della compliance del paziente, con rischio di scarsa regolarità dell'esecuzione del trattamento antiMicobatterico
- la precedente esecuzione di altri cicli di terapia
- l'incremento dei casi di Tubercolosi in soggetti ad alto rischio per forme gravi e di difficile trattamento
- l'eccessiva lentezza delle procedure convenzionali di identificazione di *M.tuberculosis* e del saggio di sensibilità ai farmaci antitubercolari
- la pandemia da HIV.

Il rischio di resistenza è particolarmente alto nei soggetti HIV positivi, poiché hanno popolazioni Micobatteriche piuttosto ingenti.

Per prevenire la comparsa di multiresistenza è consigliabile:

- l'osservazione diretta del trattamento antiMicobatterico per garantire la corretta assunzione dei farmaci
- l'utilizzazione di preparazioni farmacologiche contenenti associazioni di antiMicobatterici in combinazione fissa.

Il trattamento della Tubercolosi, con associazioni di più farmaci, ha come obiettivo principale quello di evitare la selezione di ceppi insensibili ad uno o più composti.

Sono raccomandate associazioni di tre farmaci di prima scelta per la fase intensiva del trattamento: Rifampicina, Isoniazide e Pirazinamide; per la fase di continuazione, associazioni di Rifampicina ed Isoniazide. Tuttavia pazienti provenienti da zone dove l'isolamento di ceppi con resistenza ad un singolo antitubercolare è rilevante, devono essere trattati con una quadruplica associazione (Isoniazide, Rifampicina, Pirazinamide ed Etambutolo).

L'impressione che la circolazione di ceppi multiresistenti sia in aumento e che possa costituire in futuro un serio problema di Sanità Pubblica anche nel nostro Paese, è avvalorata da recenti riscontri di epidemie intraospedaliere in soggetti con AIDS (48). La diffusione di epidemie causate da ceppi MDR (Multi Drug Resistent), sembrerebbe conseguenza sia della scarsa adesione alle terapie ed alle misure di controllo dell'infezione sia dell'adozione di regi-



mi terapeutici poco efficaci che del notevole ritardo nell'esecuzione dei test di suscettibilità antibiotica, con conseguente ritardo nel riconoscimento dei ceppi resistenti e nell'approntamento di un'adeguata terapia (30).

Ci si può attendere una diffusione anche nei soggetti immunocompetenti a contatto con malati di AIDS o con altri individui a rischio e, poi di conseguenza, nel resto della popolazione (48).

Da quanto detto, risulta necessario individuare nuovi farmaci antitubercolari. A tale proposito è stato svolto uno studio che individua i **derivati fenazinicici come potenziali agenti per il trattamento delle infezioni sostenute da *M.tuberculosis* resistenti e multiresistenti**: il confronto tra i valori di MIC ottenuti sul ceppo di riferimento virulento per i derivati fenazinicici più attivi e quelli ottenuti per Rifampicina (RMP), ha evidenziato che alcune delle molecole più attive mostrano valori di MIC inferiori o paragonabili ad essa. Tutti i derivati fenazinicici saggiati su ceppi di collezione resistenti, presentano valori di MIC notevolmente inferiori a quelli determinati per Isoniazide (INH) e RMP nei confronti dei ceppi rispettivamente resistenti. Sugli isolati clinici INH-resistenti è stato constatato che i derivati più potenti sono più attivi dell'Etambutolo e di INH. Un aspetto particolarmente interessante che emerge dai risultati ottenuti è rappresentato dal fatto che i ceppi, sia di collezione che di provenienza clinica, con caratteristiche di resistenza a RMP, che agisce, come i derivati studiati, mediante inibizione della RNA polimerasi, si dimostrano ugualmente sensibili all'azione dei derivati fenazinicici. Queste considerazioni possono assumere un significato di grande rilevanza per un eventuale impiego clinico di tali derivati (43).

### **Meccanismi di resistenza**

La multiresistenza non sembra essere causata da un singolo evento, quale l'incorporazione di trasposoni o plasmidi recanti geni di resistenza (come spesso avviene negli Enterobatteri), ma piuttosto dall'accumulo di singole mutazioni spontanee, insorte indipendentemente.

*M.tuberculosis* può acquisire la resistenza:

- Spontaneamente (resistenza primaria)
- Sotto la pressione selettiva della terapia antibiotica (resistenza secondaria).

La frequenza della resistenza primaria corrisponde all'incidenza di mutazioni genomiche spontanee che conferiscono non sensibilità all'Isoniazide ( $1:10^8$ - $1:10^9$ ), alla Rifampicina ( $1:10^8$ ), all'Etambutolo ( $1:10^6$ ) ed alla Streptomina ( $1:10^5$ ); qualora venga adoperato un solo medicinale per curare una Tubercolosi grave, i mutanti possono arrivare a predominare e provocare ricadute cliniche.

La resistenza mutazionale si sviluppa, perché, in molte lesioni tubercolari i batteri sono sufficientemente numerosi da comprendere mutanti resistenti, capaci di crescere durante il trattamento e causare pertanto una ricaduta. Se la frequenza d'insorgenza di resistenza primaria simultanea all'Isoniazide ed alla Rifampicina è complessivamente di circa  $1:10^{16}$ , la possibilità di trovare germi resistenti, in un paziente adeguatamente trattato (che alberga mediamente  $10^9$  microrganismi) è quantomeno improbabile. Ciò implica che la multiresistenza farmacologica è fondamentalmente un problema iatrogeno scatenato dalla pressione selettiva dei chemioterapici in conseguenza di inadeguata condotta terapeutica (48).

## **Metodi di Laboratorio per la diagnosi di Tubercolosi**

Negli anni passati, era considerato adeguato diagnosticare la Tubercolosi ed effettuare il trattamento terapeutico semplicemente basandosi sulla sintomatologia clinica, sull'evidenza radiologica e sulla dimostrazione di bacilli acido-alcol resistenti nel campione esaminato.

Attualmente, questi criteri non vengono più ritenuti sufficienti e, per una diagnosi completa, il microrganismo deve essere isolato, identificato e deve essere accertata la sua sensibilità ai farmaci antiMicobatterici.

## **Raccomandazioni generali per la raccolta dei campioni**

Il personale sanitario deve trattare i materiali come potenzialmente infetti, deve adottare i relativi dispositivi di protezione individuale (DPI) ed attenersi a quanto riportato nel Decreto Legislativo n° 626 del 19 Settembre 1994 e successive integrazioni (40).

Per una corretta processazione i campioni devono essere prelevati e trasportati al Laboratorio osservando i seguenti accorgimenti (32):

- o Utilizzare contenitori monouso di plastica sterili, impermeabili, con tappo a vite
- o Evitare l'uso di tamponi: nell'impossibilità di ricorrere ad altri tipi di prelievo, usare terreni di trasporto tipo Amies o Stuarts
- o Non usare fissativi o conservanti

- o Etichettare il contenitore con nome, cognome e numero identificativo del paziente, tipo di materiale e data di raccolta
- o Raccogliere il materiale in quantità sufficiente (a seconda del campione biologico), per evitare falsi negativi
- o Eseguire la raccolta nel modo più asettico possibile, per evitare la contaminazione con altri microrganismi
- o Non contaminare la superficie esterna del contenitore
- o Eseguire la raccolta prima dell'inizio della terapia antiMicobatterica
- o Inviare il campione al Laboratorio il più rapidamente possibile, per assicurare la sopravvivenza dei Micobatteri ed evitare la moltiplicazione di altri microrganismi contaminanti
- o Campioni pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere processati, segnalando al clinico i motivi del rifiuto.

Il mancato rispetto di queste raccomandazioni può inficiare l'attendibilità e l'efficacia delle successive indagini diagnostiche.

I Micobatteri possono essere ricercati in una grande varietà di campioni biologici; in generale, si possono ottenere campioni da tutte quelle zone in cui si sospetti la presenza dell'infezione tubercolare.

Poiché la localizzazione polmonare è di gran lunga la più frequente, la maggioranza dei campioni è rappresentata da secrezioni respiratorie raccolte con diverse modalità: espettorato, escreato, broncoaspirato, broncolavaggio alveolare. Gli escreti ottenuti per espettorazione devono essere raccolti il mattino, subito dopo il risveglio del paziente, poiché, non solo si ha una crescita più rapida dei Micobatteri in coltura, ma anche un minor inquinamento dei terreni, in rapporto ai campioni di escreato delle 24 ore. Dai pazienti in cui si sospetta Tubercolosi polmonare, devono essere raccolti almeno 3 campioni, poiché l'irregolarità delle ulcerazioni e della liberazione di bacilli acido-alcol resistenti, dai foci bronchiali subepiteliali di infezione tubercolare, possono essere causa di variabilità nella frequenza di isolamento: le colture possono risultare positive un giorno e negative il giorno successivo.

Per quanto riguarda l'urina, a causa dell'irregolarità della liberazione dei Micobatteri tubercolari, anche in caso di infezione renale, è necessario raccogliere il campione del mattino per 3 giorni (22).

*M. tuberculosis* è un parassita facoltativamente intracellulare, può essere presente nei macrofagi del midollo osseo, del fegato e dei linfonodi di pazienti con infezioni disseminate, quindi, possono essere utilizzati come campioni anche i prelievi biotici.

## Preparazione e trattamento dei campioni

La preparazione del campione, la sua qualità ed il trattamento relativo rappresentano un punto critico poiché questa fase preliminare influenza, per la ricerca di Micobatteri tutti gli eventuali metodi diagnostici successivi.

- **Espettorato, escreato, broncoaspirato, broncolavaggio alveolare**: i campioni provenienti dalle vie respiratorie non richiedono, in genere, preparazioni particolari prima del trattamento decontaminante. Nel caso di broncoaspirato, in quantità superiore ai 10 ml, si provvede ad una concentrazione preliminare per centrifugazione, si elimina il soprannatante e si utilizza il fondello per la decontaminazione. Per l'escreato o il broncoaspirato in quantità inferiore ai 10 ml si procede con la decontaminazione diretta.
- **Urine**: occorre centrifugare il campione preliminarmente, poi si decanta il soprannatante e si utilizza il sedimento per la decontaminazione; in seguito il campione viene riconcentrato per centrifugazione.
- **Liquidi cavitari (pleurico, peritoneale, articolare, pericardico) ed altri fluidi organici (liquor, liquido seminale, liquido biliare)**: per i fluidi organici raccolti asetticamente non è necessaria la decontaminazione. Se il campione è inferiore ai 10 ml è possibile procedere all'inoculo diretto; se il volume del materiale supera i 10 ml, si concentra per centrifugazione, si elimina il soprannatante e si usa il sedimento per l'inoculo. Nei casi in cui si sospetta contaminazione, si procede alla decontaminazione e successiva concentrazione.
- **Pus**: se il campione è in quantità inferiore a 10 ml, viene direttamente digerito, decontaminato e poi concentrato. Se la quantità di materiale è superiore occorre effettuare una centrifugazione preliminare alla decontaminazione.
- **Feci**: si sospende una piccola quantità di materiale e si omogeneizza al vortex.
- **Prelievi biotici (fegato, midollo osseo, linfonodi)**: il campione viene ridotto, con bisturi sterile, in piccoli frammenti che vengono sospesi in soluzione fisiologica ed omogeneizzati asetticamente. Poiché le biopsie di tessuto non sono abitualmente contaminate da altri microrganismi non è necessaria la decontaminazione e si può procedere direttamente all'inoculo. Se il campione non è stato raccolto in condizioni di sterilità si procede alla decontaminazione e ad una successiva centrifugazione.
- **Sangue**: i flaconi per emocoltura devono essere inoculati direttamente con circa 5 ml di sangue.

- **Aspirato gastrico:** occorre neutralizzare il pH aggiungendo al campione carbonato di sodio (NaCO<sub>3</sub>). Se il volume del campione è superiore a 10 ml, è necessario concentrare preliminarmente per centrifugazione, poi decontaminare e riconcentrare per centrifugazione; se il campione è inferiore è possibile decontaminare direttamente, concentrare e successivamente inoculare.

## Decontaminazione-digestione

L'isolamento dei Micobatteri dai materiali clinici potenzialmente contaminabili pone particolari problemi al Laboratorio. I Micobatteri hanno un lungo tempo di replicazione (dell'ordine di 15-22 ore per *M.tuberculosis*), mentre il tempo di duplicazione di altri batteri, possibilmente presenti nel campione, può essere anche di soli 20-30 minuti. Questa sproporzione, tra il ritmo di crescita dei Micobatteri e quello degli altri batteri, può causare un rapido accumulo di cataboliti acidi che liquefanno il terreno e lo rendono inadatto alla crescita Micobatterica. Per questo motivo l'isolamento dei Micobatteri dipende in gran parte dall'inibizione selettiva dei batteri contaminanti (22).

L'alto contenuto lipidico nella parete dei Micobatteri, li rende più resistenti all'inattivazione da parte di soluzioni forti di acidi o basi, rispetto agli altri batteri, eventualmente presenti nel campione. Perciò, i campioni in cui si sospetta la presenza di una flora batterica mista vengono trattati con agenti decontaminanti forti, allo scopo di limitare la crescita batterica indesiderata.

Ad eccezione di alcuni tipi di materiale prelevati in condizioni sterili, la maggior parte dei campioni dopo un eventuale trattamento preliminare, deve subire un processo di decontaminazione per eliminare la flora batterica associata che finirebbe per nascondere o impedire la crescita di Micobatteri, qualora presenti.

Alcune soluzioni decontaminanti sono così energiche da inattivare totalmente o danneggiare gravemente i Micobatteri presenti nel campione, riducendo o annullando completamente la possibilità di un loro isolamento. Diminuendo le concentrazioni degli acidi o degli alcali, presenti nelle soluzioni decontaminanti, si ha un migliore isolamento dei Micobatteri nelle colture, associato però ad una maggiore incidenza di contaminazioni (22).

Il metodo di decontaminazione che impiega idrato di sodio e N-acetil-L-cisteina è quello che normalmente viene considerato di riferimento. È fondamentale osservare con rigore i tempi di trattamento: i campioni insufficiente-

mente trattati producono una maggior contaminazione e, nel caso di escreato, restano mucoidi; quelli troppo lungamente trattati producono un numero minore di colture positive e richiedono un tempo di rilevazione più lungo. Quando i tempi della metodica vengono scrupolosamente rispettati, il sistema si dimostra in grado di contenere al di sotto del 5% l'incidenza delle contaminazioni delle colture, senza danneggiare eccessivamente i Micobatteri (54).

Tra le metodiche alternative devono essere ricordate le seguenti:

1. Laurisolfato di sodio: efficace nel controllo delle contaminazioni, ma di complessa esecuzione
2. Ammoni quaternari: consentono una buona tolleranza dei tempi di contatto, ma non sono utilizzabili con terreni privi di uovo
3. Acido Ossalico: indicato per campioni contaminati da *Paeruginosa*, ma potenzialmente lesivo per i Micobatteri.

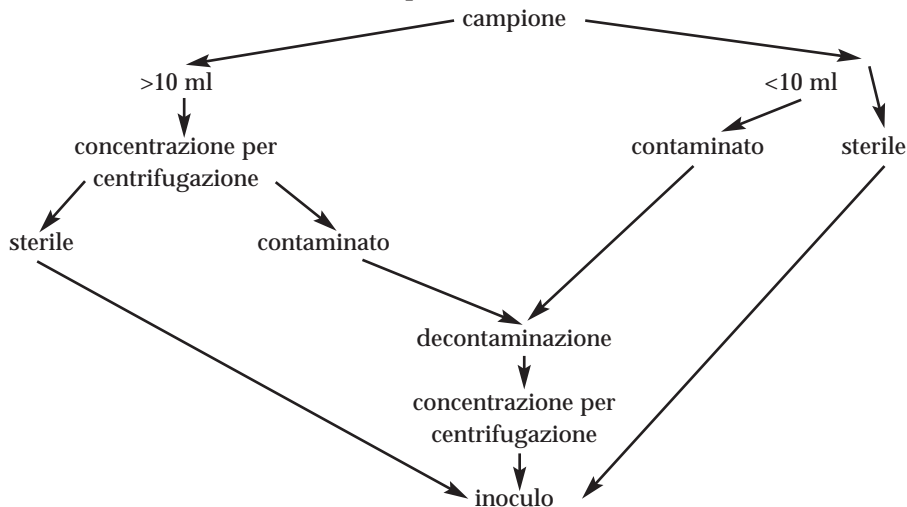
Per alcuni di questi procedimenti esistono incompatibilità sia per la semina su terreni a base di agar, che per l'esecuzione delle tecniche di amplificazione; al contrario, il sistema basato su NaOH/N-acetil-L-cisteina può essere impiegato con i più svariati tipi di terreno (anche liquidi) ed è compatibile con le moderne tecnologie (51).

## Centrifugazione

La regolazione della forza centrifuga è importante ai fini dell'isolamento dei Micobatteri da materiali clinici e per la correlazione tra positività dell'esame microscopico ed isolamento in coltura. La base di questa osservazione è nei peculiari caratteri fisici conferiti ai Micobatteri dall'alto contenuto di lipidi della parete che rendono estremamente basso il peso specifico del microrganismo. Se si deve sedimentare il microrganismo, durante la digestione e la concentrazione del campione, è necessario mantenere il più basso possibile la densità del diluente. Per lo stesso motivo la forza centrifuga da applicare al campione deve essere la maggiore ottenibile. Un incremento delle positività degli isolamenti in coltura è stato ottenuto aumentando la forza fino a valori di 3000/ 4000 x g; valori superiori sono sconsigliabili per il rischio di collasso del fondo conico delle provette in plastica usate per la centrifugazione.

È stato documentato che, oltre alle elevate velocità, anche l'uso di centrifughe refrigerate, contribuisca ad aumentare il numero di Micobatteri isolati, evitando di sottoporli ad uno shock termico (22).

### Algoritmo del trattamento di decontaminazione e concentrazione dal campione all'inoculo



## Esame microscopico

L'esame batterioscopico per la ricerca dei Micobatteri ed in particolare del *M.tuberculosis* rappresenta un metodo diagnostico importante, ma non sufficiente, per la diagnosi della Tubercolosi e delle infezioni da Micobatteri (Micobatteriosi).

Le colorazioni adottate per l'esame microscopico, in Micobatteriologia, sfruttano l'acido-alcol resistenza, proprietà distintiva dei Micobatteri, che permette di appurare, con un ampio margine di sicurezza, se i microrganismi evidenziati in un campione clinico appartengano o meno al genere *Mycobacterium* (51). I Micobatteri possiedono una parete cellulare ricca di acidi grassi a catena lunga, gli acidi micolici; tale caratteristica li differenzia dagli altri microrganismi e rende ragione dell'acido-alcol resistenza (37). Infatti, l'elevato contenuto lipidico rende difficoltosa la penetrazione dei coloranti nella parete batterica, ma una volta avvenuta, il colorante resta "intrappolato", legandosi stabilmente agli acidi micolici e non viene più rilasciato neanche in seguito ad energici trattamenti di decolorazione con alcol e acidi (acido cloridrico al 3% in alcol etilico) (51).

L'esame microscopico permette di monitorare l'efficacia della terapia; la determinazione del numero di Micobatteri nel campione esaminato, durante



il trattamento terapeutico, fornisce un precoce ed obiettivo riscontro della risposta al trattamento.

Anche rispetto alle nuove metodologie di contenuto tecnologico più elevato, l'esame microscopico conserva un significato che non può essere sostituito.

Un risultato positivo, ottenuto con le sonde genetiche, non fornisce un'informazione semiquantitativa quale una valutazione del decremento numerico di bacilli acido-alcol resistenti, osservabile con l'esame microscopico, in strisci consecutivi di un paziente sottoposto a terapia mirata e corretta.

Proprio questa caratteristica rappresenta uno dei punti di forza dell'esame, tanto da portare alla definizione di un criterio universalmente accettato che, un paziente con Tubercolosi attiva e sottoposto a terapia efficace, può lasciare il reparto di isolamento, solo quando tre strisci consecutivi risultano negativi per la presenza di bacilli acido-alcol resistenti. Inoltre, qualora il numero dei microorganismi non diminuisca dopo un certo tempo dall'inizio della terapia, si deve considerare la possibilità della comparsa di ceppi resistenti; tale sospetto deve essere confermato dall'esame colturale e dai test di sensibilità *in vitro* ai farmaci.

### ***Punti di attacco della microscopia***

- Sensibilità del 45-60 % in campioni respiratori
- Bassa sensibilità per campioni non-respiratori
- Alta variabilità inter-Laboratorio
- Non specifica per *M.tuberculosis*
- Non adatta per la processazione di quantitativi medio-alti di campioni, ad eccezione dell'utilizzo della colorazione con Auramina che però richiede l'impiego di microscopi a fluorescenza.

### ***Sensibilità della microscopia***

La microscopia, pur presentando il notevole vantaggio della rapidità, trova nella ridotta sensibilità il suo limite maggiore. La sensibilità dei metodi di colorazione è data dalla minima quantità di batteri che devono essere presenti nel preparato per avere una buona probabilità di essere osservati al microscopio; la soglia di positività microscopica è di circa 5000-10.000 bacilli acido-alcol resistenti per ml di materiale patologico. Ciò rende ragione della frequenza con cui ad un esame batterioscopico positivo corrisponde la positività della coltura. pazienti con malattia in stadio avanzato eliminano grandi quantità di Micobatteri e vi è una buona correlazione tra la positività del-

l'esame microscopico e quella dell'esame colturale. Per esempio, quando sono presenti più di 6 bacilli acido-alcol resistenti per campo microscopico negli strisci di un dato campione, la coltura dello stesso materiale porta sempre all'isolamento di un Micobatterio patogeno.

Però la maggior parte dei pazienti presenta infezioni in stadio meno avanzato e la corrispondenza tra la positività degli esami microscopici e culturali può risultare solo del 25-40%.

### ***Specificità della microscopia***

La specificità dell'esame microscopico è elevata. Falsi risultati positivi (campioni con presenza di bacilli acido-alcol resistenti e colture negative), variano dal 10-20 % (Tabella 9).

<b>Positività dello striscio</b>	<b>N° colonie</b>
13%	1-10
71%	11-50
78%	51-100
92%	> 100

***Tabella 9. Correlazione tra numero di colonie sviluppate in coltura e positività dell'esame microscopico come documentato dalla letteratura.***

Operando in ambienti con rigorosi protocolli la percentuale si riduce; vanno considerati anche gli errori degli operatori e l'influenza, sul risultato dell'esame microscopico, della frequente analisi di campioni che provengono da pazienti sottoposti a terapia. Questi soggetti possono avere bacilli nello striscio, ma colture negative a causa della non vitalità degli stessi, in quanto già uccisi dal trattamento farmacologico. L'esame microscopico non fornisce, ovviamente, alcuna informazione riguardo alla vitalità dei Micobatteri osservati; non è quindi raro refertare, in pazienti in terapia, colture negative da campioni positivi microscopicamente.

Nei pazienti trattati, circa il 30 % dei campioni sottoposti all'esame microscopico presenta questo comportamento.

Nei soggetti non trattati la percentuale dei campioni falsi positivi è circa del 7.5 %.

Prolungate procedure di decontaminazione del materiale possono danneggiare i Micobatteri presenti e causare dei risultati apparentemente falsi positivi. Infatti, dopo un trattamento di decontaminazione troppo drastico, si deve aumentare il tempo di incubazione del terreno, onde consentire ai bacil-

li di riparare i danni subiti e dare origine ad una crescita sufficientemente rigogliosa. In caso contrario si potrebbe avere un esame batterioscopico positivo senza una corrispondente crescita su terreno.

Tra le cause più frequenti di errore dell'operatore sono da segnalare:

- Il mancato impiego di vetrini nuovi e ben puliti
- La mancata pulizia delle varie lenti degli obiettivi del microscopio che è causa di cross-contaminazioni
- L'uso di acqua contaminata da Micobatteri saprofiti.

### **Preparazione dello striscio**

- Usare vetrini nuovi e ben sgrassati, opportunamente contrassegnati con i dati identificativi del campione. Preparare due vetrini per campione, tal quale e previa decontaminazione.
- Trasferire circa 50 µl del materiale sulla superficie del vetrino usando un'ansa o una pipetta. Distribuire il materiale uniformemente su una superficie di circa 2 x 1 cm, prestando attenzione che il preparato non risulti eccessivamente spesso, tale da nascondere i bacilli eventualmente presenti. Importante è la scelta dei frammenti di materiale da distendere sul vetrino: nell'escreato vanno prelevate le parti purulente ed eventualmente le particelle caseose. Per il liquor ed i broncoaspirati è preferibile limitare la zona di distribuzione del materiale e ricorrere alla sua "stratificazione": questa si esegue distendendo con l'ansa una goccia sul vetrino, attendendo che si asciughi e ripetendo successivamente l'operazione con altre 2-3 ansate di materiale.
- Lasciare asciugare all'aria .
- Fissare i vetrini passandoli per non più di 3-4 volte alla fiamma blu o incolore di un becco Bunsen.

### **Colorazione**

Due sono i metodi di colorazione più comunemente usati per rilevare l'acido-alcol resistenza:

- 1) Colorazione con fucsina fenicata o carbofucsina: una miscela di fucsina e fenolo (acido carbolico).
  - a) Ziehl-Neelsen
  - b) Kinyoun

- 2) Colorazione fluorocromica: auramina O, eventualmente associata ad un secondo fluorocromo come la rodamina.

### **Colorazione di Ziehl-Neelsen (carbolfucsina a caldo)**

È la colorazione più nota tra quelle in grado di evidenziare la acido-alcol resistenza.

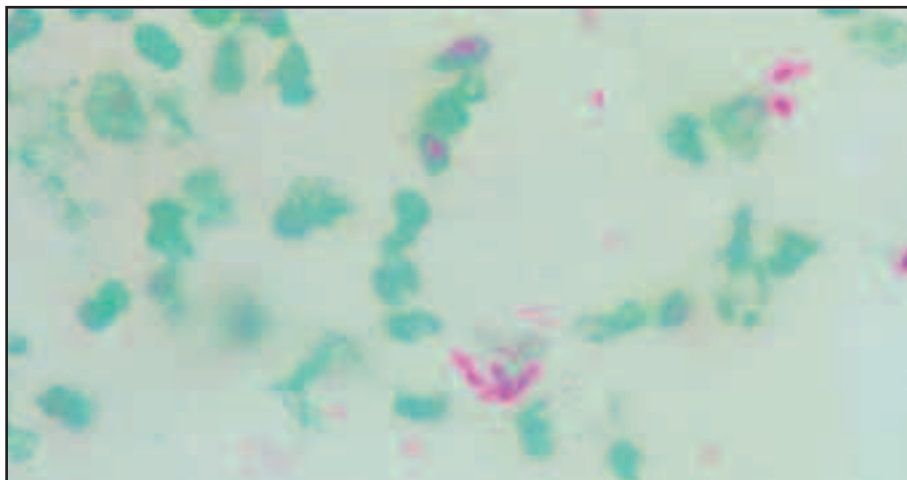
#### *Reagenti:*

- o Carbolfucsina di Ziehl: preparare una soluzione contenente 0,3 g di fucsina basica in 10 ml di etanolo al 95%; aggiungere 90 ml di una soluzione acquosa di cristalli di fenolo al 4,5%. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.
- o Decolorante: aggiungere 3 ml di acido cloridrico concentrato a 97 ml di etanolo al 95%. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.
- o Colorante di contrasto: sciogliere 0.3 g di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.

#### *Procedimento:*

- o Coprire il vetrino con carbolfucsina. Scaldare delicatamente il vetrino passandolo sotto la fiamma di un becco Bunsen o di un batuffolo di cotone impregnato di alcol fino alla formazione dei primi vapori (il riscaldamento facilita la penetrazione della carbolfucsina nello spessore della parete Micobatterica). Colorare per 5 minuti, aggiungendo nuovo colorante se necessario. Lasciare raffreddare.
- o Lavare delicatamente con acqua di fonte. Rimuovere dal vetrino l'acqua residua per scolatura.
- o Decolorare con acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 secondi, finchè non v'è più traccia di colorante nel lavaggio con acqua di rubinetto.
- o Colorare con blu di metilene per 1 minuto.
- o Lavare con acqua di rubinetto delicatamente. Eliminare il residuo di acqua dal vetrino per scolatura o scuotimento leggero.
- o Asciugare all'aria ed osservare al microscopio ottico con obiettivo 100x ad immersione o 50x ad acqua.

I Micobatteri appaiono di colore rosso e non blu (Figura 1).



**Figura 1.**

### **Colorazione di Kinyoun (carbolfucsina a freddo)**

#### **Reagenti:**

- o **Carbolfucsina di Kinyoun:** preparare una soluzione contenente 4 g di fucsina basica in 20 ml di etanolo al 95%; aggiungere 100 ml di acqua distillata in cui sono stati sciolti a caldo 8 g di fenolo in cristalli. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.
- o **Decolorante:** aggiungere 3 ml di acido cloridrico concentrato a 97 ml di etanolo al 95%. Conservare per tre mesi a temperatura ambiente.
- o **Colorante di contrasto:** sciogliere 0.3 g di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.

#### **Procedimento:**

- o Coprire il vetrino con carbolfucsina. Colorare per 5 minuti; questa colorazione permette di evitare la fase di riscaldamento.
- o Lavare delicatamente con acqua corrente in modo accurato. Eliminare il residuo di acqua dal vetrino per scuotimento leggero.
- o Decolorare con acido-alcòl effettuando due o piú passaggi della durata di 30 secondi, finchè non vi sia piú traccia di colorante nel lavaggio con acqua di fonte.
- o Colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi.
- o Lavare con acqua di rubinetto evitando il getto violento e scolare.
- o Asciugare all'aria ed osservare al microscopio con obiettivo 100x ad immersione o 50x ad acqua.

I Micobatteri appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore blu.

Le colorazioni di Ziehl-Neelsen e di Kinyoun, che consentono un'ottima definizione della morfologia batterica, sono le più idonee per quei Laboratori che processano giornalmente un numero limitato di campioni.

### **Colorazione con auramina**

È una tecnica che, pur sfruttando lo stesso principio alla base della colorazione di Ziehl-Neelsen, utilizza la fluorescenza: in luogo della fucsina basica fenicata viene impiegato un fluorocromo (auramina O oppure auraminarodamina), che si lega in modo diretto ai lipidi di parete, con meccanismi fisico-chimici. Al posto del blu di metilene viene usato il permanganato di potassio che ha la funzione di attenuare eventuali fluorescenze di fondo.

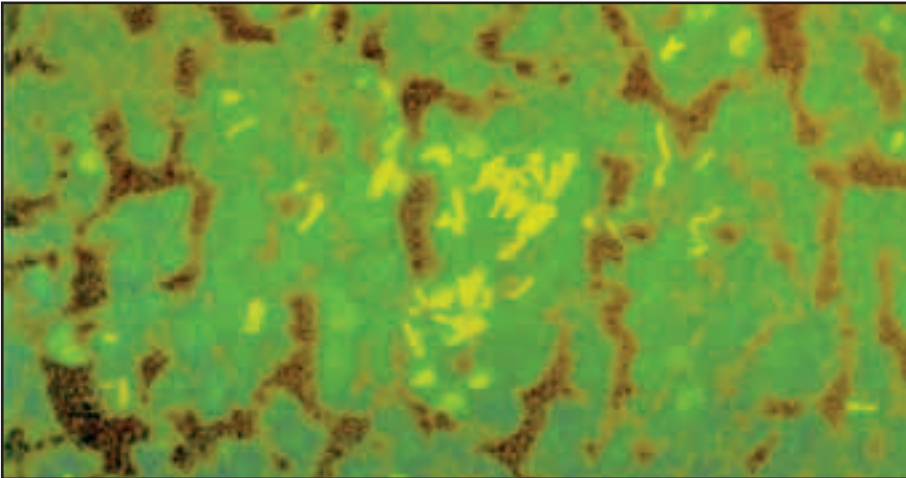
#### **Reagenti:**

- o **Auramina:** preparare una soluzione contenente 0,1 g di auramina O in 10 ml di etanolo al 95%; aggiungere 87 ml di acqua distillata in cui sono stati sciolti 3 g di fenolo in cristalli. Conservare al buio in bottiglia scura a temperatura ambiente per tre mesi.
- o **Decolorante:** aggiungere 0,5 ml di acido cloridrico concentrato a 100 ml di etanolo al 70%. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.
- o **Colorante di contrasto:** sciogliere 0,5 g di permanganato di potassio in 100 ml di acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente per tre mesi.

#### **Procedimento:**

- o Coprire il vetrino con auramina, colorare per 15 minuti senza riscaldare.
- o Lavare con acqua corrente delicatamente evitando il getto violento, sarebbe meglio usare una spruzzetta con acqua distillata. Eliminare il residuo di acqua dal vetrino per scolarura o per scuotimento leggero.
- o Decolorare con acido-alcol per 2-3 minuti.
- o Lavare con acqua di fonte o distillata in modo accurato. Scolare.
- o Colorare con permanganato di potassio per non più di 2 minuti. Se lasciato agire più a lungo, il permanganato di potassio può legarsi all'auramina, mascherando così la presenza di eventuali bacilli acido-alcol resistenti.
- o Lavare delicatamente con acqua di rubinetto. Rimuovere dal vetrino l'acqua residua per scuotimento leggero.
- o Asciugare all'aria ed osservare entro 24 ore al microscopio a fluorescenza con obiettivo da 40x.

I Micobatteri appaiono fluorescenti in giallo brillante con lo sfondo scuro (Figura 2).



**Figura 2.**

Le modificazioni della colorazione con auramina includono l'aggiunta di rodamina, che conferisce un aspetto dorato ai Micobatteri, o l'uso dell'arancio di acridina, come colorazione di contrasto, che produce uno sfondo rosso tendente all'arancio.

Si può usare un obiettivo 100x ad immersione per osservare meglio le caratteristiche morfologiche dei Micobatteri.

Nei casi dubbi si può ricolorare con carbolfucsina (metodo di Ziehl-Neelsen o di Kinyoun), il preparato già colorato con auramina. Ciò può essere effettuato senza rimuovere la colorazione fluorocromica (il procedimento inverso non risulta, invece, soddisfacente). Si può scegliere di usare la colorazione fluorocromica per un esame preliminare e quindi confermare i risultati ottenuti riesaminando il vetrino dopo una sovracolorazione con fucsina fenicata.

La possibilità di usare, in fluorescenza, ingrandimenti inferiori rispetto a quelli delle colorazioni con carbolfucsina, permette la scansione in tempi più brevi di una più ampia superficie di vetrino, con conseguente aumento della sensibilità del test.

È stato calcolato che per un'accurata osservazione di un preparato colorato con carbolfucsina occorrono 10 minuti, mentre con la colorazione fluorocromica è sufficiente 1 minuto. La fluorescenza risulta più adatta ai Laboratori con un carico di lavoro elevato.



## Controllo di qualità

Controlli positivo e negativo dovrebbero essere inclusi, quotidianamente, fra i preparati microscopici, allo scopo di verificare la corretta performance delle procedure; verifica tanto più importante quanto minore è il numero di campioni esaminati dal singolo Laboratorio. I controlli devono essere letti e verificati prima dell'osservazione microscopica dei campioni clinici. *E.coli* e *M.tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) sono comunemente usati rispettivamente come controllo negativo e positivo.

## Osservazione e refertazione

All'osservazione microscopica i bacilli acido-alcol resistenti appaiono come lunghi e sottili bastoncini, talvolta ricurvi, isolati o più spesso riuniti a gruppetti. Alcuni possono presentare un aspetto bandeggiato con zone scarsamente colorate o del tutto prive di colore. Alcune specie di Micobatteri non tubercolari hanno un aspetto microscopico pleomorfo, che può andare dalle forme coccoidi a quelle allungate.

È consigliabile esaminare il vetrino osservando almeno un centinaio di campi microscopici prima di considerarlo negativo.

Per assicurare la bontà del test è conveniente adottare un metodo di lettura che garantisca l'osservazione di una parte significativa del preparato; esistono due metodi per scorrere il preparato (37):

1. Si scorre il vetrino longitudinalmente per 3 volte lungo l'asse maggiore partendo da un estremo superiore (destra o sinistra) e si percorrono tutti i campi microscopici lungo 3 linee ideali e parallele
2. Si scorre il vetrino trasversalmente per 9 volte lungo l'asse minore partendo da un estremo (superiore o inferiore) e si percorrono tutti i campi microscopici lungo 9 brevi linee ideali e parallele.

Quando l'esame microscopico fornisce esito positivo, la refertazione segue lo schema riportato in Tabella 10, in base al tipo di colorazione usata ed al numero di bacilli acido-alcol resistenti presenti nei campi microscopici osservati (37).

Carbolfucsina (100x) N° bacilli acido-alcol resistenti	Auramina (40x)	REFERTO
0	0	Non si osservano bacilli acido-alcol resistenti
1-2/ vetrino	1-2/ 70 campi	Rari bacilli acido-alcol resistenti (ripetere)
1-9/ 100 campi	2-18/ 50 campi	+
1-9/ 10 campi	4-36/ 10 campi	++
1-9/ campo	4-36/ campo	+++
>9/ campo	>36/ campo	++++

**Tabella 10. Schema di refertazione.**

## Esame culturale

I Micobatteri presentano esigenze metaboliche tali da non consentirne lo sviluppo sui comuni terreni impiegati in batteriologia; devono essere utilizzati specifici terreni culturali, disponibili sia in fase solida che liquida (51). È fortemente raccomandata l'esecuzione della coltura abbinando i due terreni (25).

### Terreni solidi

Verso la fine del XIX secolo, i primi tentativi di isolamento di Micobatteri, da terreni contenenti agar, furono poco soddisfacenti; tuttavia, si scoprì che un terreno di coltura contenente uova intere, farina di patate, glicerolo e sali, solidificato mediante riscaldamento, era efficace per l'isolamento di *M. tuberculosis*. Più tardi si riscontrò che l'aggiunta di coloranti di anilina, quali il verde di malachite o il cristal violetto, erano utili per l'inibizione dei batteri contaminanti, sebbene in quantità eccessiva, possano inibire anche la crescita Micobatterica (22).

La coltura in fase solida comporta lunghi tempi di risposta fino a 60 giorni in relazione alla carica batterica presente nel campione in esame, inoltre richiede una regolare ispezione (almeno settimanalmente) da parte dell'operatore, per il rilevamento di eventuali positività o contaminazioni. La resa dipende dalla qualità del campione processato che deve essere accuratamente controllato dalla raccolta alla semina.

D'altra parte la coltura in fase solida ha un'alta sensibilità, soprattutto se combinata con la coltura liquida; è semplice da eseguire e si adatta a tutti i tipi di campioni.

I terreni di coltura solidi possono avere come base l'uovo o l'agar e possono essere distinti in terreni selettivi e terreni non selettivi (27). Quelli di uso più frequente sono, ancora oggi, quelli a base di uovo. Ne esistono di varie formulazioni che si differenziano per i componenti accessori (51).

I terreni solidi sono normalmente confezionati in provette a becco di clarino, con tappo a vite. Sui terreni solidi i Micobatteri si moltiplicano formando colonie visibili a occhio nudo (21).

### **Terreni di coltura non selettivi**

Comunemente per l'isolamento dei Micobatteri vengono usati terreni di coltura contenenti uovo. Tra questi, quello usato con maggior frequenza è il terreno di Löweinstein-Jensen: in esso infatti si realizza un buon equilibrio tra le due opposte esigenze di (51):

- Costituire un fertile substrato per i Micobatteri
- Inibire lo sviluppo di germi contaminanti.

Il terreno di Petraghani ha un maggior effetto inibente e dovrebbe essere usato solo con campioni che contengono un'alta quantità di batteri contaminanti. Il terreno della American Thoracic Society (ATS) ha minore attività inibente; è utile per l'isolamento primario dei Micobatteri da campioni come il liquido cefalorachidiano e le biopsie di tessuti, in cui la contaminazione con altri microrganismi è meno probabile (22).

La differente attività inibente di questi tre terreni è dovuta ad un diverso contenuto di verde di malachite, sostanza ad azione antisettica che rende parzialmente selettivo il medium, ostacolando in misura maggiore o minore, in base alla sua concentrazione, lo sviluppo dei microrganismi della flora associata (51).

Negli anni '50 Cohen e Middlebrook misero a punto una serie di terreni di coltura a composizione chimica definita, preparati utilizzando sali e composti organici, con l'aggiunta di agar.

Questi terreni semisintetici a base di agar costituiscono l'alternativa ai terreni solidi all'uovo; le due formulazioni disponibili sono: Middlebrook 7H10 ed Middlebrook 7H11. Quest'ultimo differisce dal primo in quanto contiene anche idrolizzato di caseina, sostanza dimostratasi utile per aumentare la resa e la velocità di crescita dei Micobatteri resistenti all'Isoniazide (22).

I terreni a base di agar possono essere confezionati in provette a becco di clarino o in piastre di Petri (27).

In Tabella 11 sono elencati terreni solidi non selettivi sia all'uovo, che a base di agar, con le rispettive composizioni.

### **Terreni di coltura selettivi**

L'uso di terreni di coltura addizionati con sostanze antimicrobiche, aumenta la possibilità di isolare Micobatteri da campioni pesantemente con-

Terreno	Componenti	Sostanza inibitrice
Löwenstein-Jensen	Uova intere coagulate, sali, glicerolo, fecola di patate	Verde di malachite 0,025 g/100 ml
Petragnani	Uova intere coagulate, tuorlo d'uovo, latte, intero, patate, fecola di patate, glicerolo	Verde di malachite 0,052 g/100 ml
American Thoracic Society medium	Tuorli d'uovo freschi coagulati, fecola di patate, glicerolo	Verde di malachite 0,02 g/100 ml
Middlebrook 7H10	Sali, vitamine, cofattori, acido oleico, albumina, catalasi, glicerolo, destrosio	Verde di malachite 0,0025 g/100 ml
Middlebrook 7H11	Sali, vitamine, cofattori, acido oleico, albumina, catalasi, glicerolo, destrosio, idrolizzato di caseina allo 0,1%	Verde di malachite 0,0025 g/100ml

**Tabella 11. Terreni di coltura non selettivi per l'isolamento di Micobatteri.**

taminati, inibendo l'inquinamento da batteri e da funghi; alcune sostanze antimicrobiche possono però inibire anche la crescita dei Micobatteri stessi.

Quello più usato è il terreno di Gruft, costituito da Löwenstein-Jensen addizionato con Penicillina, Acido Nalidixico e RNA.

Altri terreni selettivi contengono come sostanze inibitrici: Cicloesimide, Lincomicina e Acido Nalidixico, che consentono il controllo sia dei contaminanti batterici, che fungini.

Il terreno selettivo 7H11 di Mitchison contiene come inibenti: Carbenicillina, Polimixina B, Trimetoprim e Amfotericina B (27).

## Terreni liquidi

Esistono diversi sistemi per la rilevazione di Micobatteri che utilizzano terreni liquidi; sono suddivisi in manuali, semiautomatici o automatici, qualora sia previsto o meno l'impiego di apparecchi automatici, per l'incubazione e/o la lettura:

- Manuali: Septi-Check AFB, MGIT e MB-Redox
- Semiautomatici: Bactec 460 TB
- Automatici: Bactec 9000/F MB, Bactec MGIT 960, ESP Culture System II e MB/BacT

I terreni liquidi sono contenuti in flaconi chiusi con un setto di gomma o in provette con tappo a vite ed è, generalmente, prevista l'aggiunta, al terre-

no di coltura, di arricchimento ed un supplemento costituito da miscela di antibiotici (25).

I vari sistemi di coltura automatizzati rilevano lo sviluppo batterico in base alle variazioni di determinati parametri metabolici: variazioni di pressione (il metabolismo dei Micobatteri è caratterizzato dalla produzione di gas), produzione di anidride carbonica o consumo di ossigeno (entrambi caratteristici del metabolismo aerobio dei Micobatteri). Le variazioni del parametro in esame, all'interno del terreno, vengono monitorizzate ad intervalli regolari, da apparecchi automatici che segnalano la positivizzazione della coltura, sulla base di complessi algoritmi.

Tali sistemi permettono di accorciare i tempi di positivizzazione (40-45 giorni) e di ottenere una più elevata sensibilità in confronto alle colture su terreni solidi (25).

La presenza di colonie sul terreno solido o la positivizzazione di un flacone di terreno liquido in un sistema automatico, non necessariamente sono indici di sviluppo di Micobatteri: è, quindi, indispensabile confermare l'acido-alcol resistenza dei microrganismi sviluppatasi eseguendo uno striscio microscopico di una delle colonie o di una goccia di brodocoltura. Una eventuale risposta positiva informa esclusivamente sullo sviluppo di Micobatteri (o quantomeno di bastoncini acido-alcol resistenti), senza alcuna prova della natura tubercolare o meno dei bacilli, che può essere attestata solo da una successiva identificazione (51).

La tecnologia di rilevamento della crescita Micobatterica in fase liquida del sistema Bactec MB è basata su un sofisticato metodo fluorimetrico sensibile alla tensione di O<sub>2</sub>. Un sensore contenente composti fluorescenti sensibili all'ossigeno è posto sul fondo di ciascun flacone, incorporato in una matrice solida protettiva: in questo modo il sensore non viene influenzato da fattori ambientali ed esterni come luce ed emolisi.

La matrice solida di silicone, inoltre, consente la diffusione selettiva dell'ossigeno dal brodo di coltura.

L'ossigeno presente nel flacone inibisce l'emissione di fluorescenza da parte del sensore; la crescita eventuale di Micobatteri genera un consumo di ossigeno con conseguente aumento della quantità di fluorescenza emessa che viene misurata dall'apparecchio.

La tecnologia di rilevamento della fluorescenza del Sistema Bactec 9000 consente al software di gestione la costruzione di curve di crescita molto precise (Figure 3, 4) e quindi l'applicazione di fini parametri di positività che permettono di determinare la crescita Micobatterica in tempi ridotti.

## Tecniche di amplificazione genica

Quando esiste un sospetto clinico di infezione da *M.tuberculosis*, una diagnosi di Laboratorio rapida ed affidabile è una necessità non soltanto clinica, a beneficio del paziente, ma anche epidemiologica, a vantaggio dell'intera comunità. La possibilità di accertare in breve tempo la diagnosi, conoscendo la specie e la sensibilità farmacologica dei Micobatteri isolati, permette di isti-

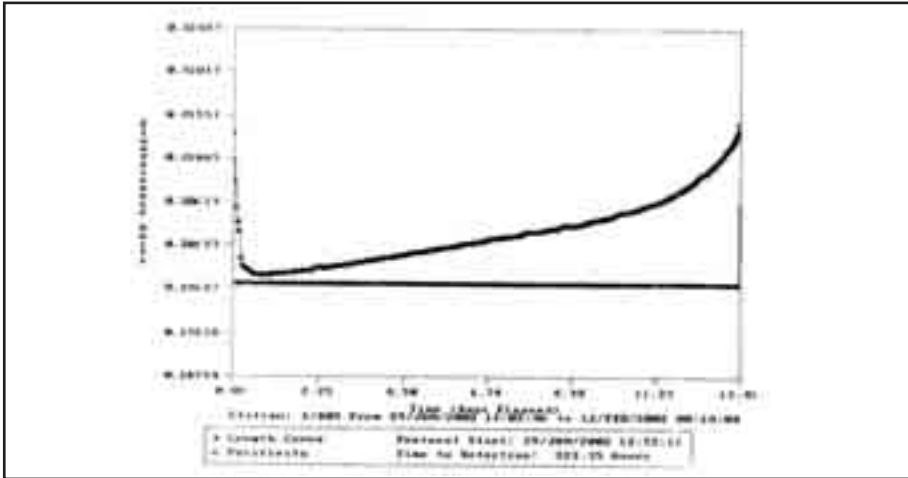


Figura 3.

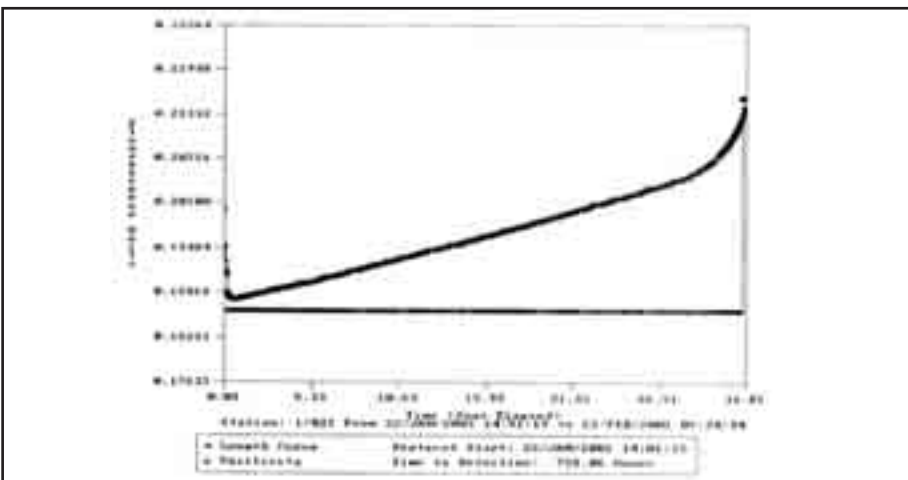


Figura 4.

tuire una terapia tempestiva e specifica, nonché, di porre in atto le misure di contenimento della diffusione della malattia (4).

Con l'affermarsi delle biotecnologie il bersaglio del microbiologo, normalmente costituito dal microrganismo, si è progressivamente spostato su alcuni suoi componenti, quali gli acidi nucleici, di cui è possibile, grazie alle procedure di amplificazione, produrre molte copie con conseguente aumento dei livelli di sensibilità (5).

La necessità di disporre di una diagnostica rapida ed altamente sensibile, per la Tubercolosi, ha portato allo sviluppo di tecniche di amplificazione genica per la ricerca diretta di *M.tuberculosis* complex da campioni clinici, respiratori ed extra-polmonari. Tali tecniche, pur essendo di recente introduzione, sono attualmente molto diffuse nei Laboratori di Micobatteriologia e sono ormai parte integrante della diagnostica microbiologica della Tubercolosi.

L'amplificazione degli acidi nucleici (DNA o RNA) permette di ottenere, in poche ore, milioni di copie delle sequenze nucleotidiche selezionate dei Micobatteri presenti nei campioni e consente di ottenere risultati in poche ore, a confronto delle settimane richieste dalla coltura.

Nelle tecniche di Biologia molecolare, comunemente usate per la ricerca diretta del *M.tuberculosis* complex, l'oggetto dell'amplificazione è la sequenza bersaglio: si producono moltissime copie della sequenza target, utilizzando la stessa come stampo.

Esistono sul mercato diverse tecniche di amplificazione genica (6):

1. **Polymerase Chain Reaction (PCR)**: la reazione a catena della polimerasi è una tecnica di amplificazione di un segmento specifico di DNA che utilizza una coppia di primer e la DNA polimerasi. Usando cicli termici, comprendenti una fase di denaturazione del DNA a temperatura elevata, una fase di appaiamento dei primer a temperatura più bassa ed una fase di estensione del filamento a temperatura intermedia, si realizza l'amplificazione esponenziale della sequenza bersaglio.
2. **Transcription Mediated Amplification (TMA)**: utilizza una coppia di primer e due enzimi, trascrittasi inversa e RNA polimerasi, per individuare l'acido nucleico bersaglio e produrre DNA, a sua volta utilizzato, per la trascrizione di RNA (fino a dieci miliardi di molecole in un'ora). La TMA, essendo una reazione isoterica, non utilizza cicli termici, essa è inoltre estremamente veloce, dal momento che in 15-30 minuti può produrre miliardi di copie della sequenza bersaglio, obiettivo che, con la PCR o la LCR, non può essere raggiunto in meno di 3-4 ore.



3. **Ligase Chain Reaction (LCR)**: si basa su due coppie di sonde oligonucleotidiche che ibridizzano con sequenze contigue dello stesso filamento di DNA. Tra le due sonde rimane un gap di pochi nucleotidi che viene colmato dalla DNA polimerasi, successivamente, la ligasi lega covalentemente tra loro le sonde. In una reazione ciclica, utilizzando una ligasi termostabile, il prodotto che si forma serve da stampo per le successive reazioni di amplificazione. La LCR, analogamente alla PCR, usa cicli termici.

Esistono diversi tests per la ricerca diretta di *M.tuberculosis* in campioni clinici come:

- LCx *M.tuberculosis*: test che utilizza la reazione a catena della ligasi (LCR) per la ricerca di DNA di *M.tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria
- Amplicor *M.tuberculosis*: test che utilizza la PCR per la determinazione qualitativa di *M.tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria (51).
- Amplified *M.tuberculosis* Direct Test (MTD): test di amplificazione genica per la ricerca qualitativa *in vitro* di r-RNA del *M.tuberculosis* complex direttamente da campioni clinici di natura respiratoria (espettorati, escreti, broncoaspirati, broncolavaggi...), che utilizza la Transcription Mediated Amplification (TMA). Secondo tale tecnologia il campione in esame viene trattato con ultrasuoni, per lisare i microrganismi eventualmente presenti; il materiale genomico liberatosi, viene sottoposto a denaturazione termica; successivamente grazie all'azione combinata di enzimi, quali la trascrittasi inversa e la RNA polimerasi ed in presenza degli opportuni nucleotidi e primers, si ottiene:
  - La sintesi di DNA a partire da RNA batterico: la reazione isoterma TMA amplifica a 42° C l' r-RNA target, tramite la trascrizione di molecole intermedie di DNA
  - La sintesi di ulteriori copie di RNA dal DNA neosintetizzato: tali molecole di RNA amplificato sono dette "ampliconi".

Al termine della fase di amplificazione, viene effettuata l'identificazione utilizzando probes marcati con esteri di acridinio e applicando la metodologia Hybridization Protection Assay (HPA), che consente un'agevole distinzione tra probe ibridizzato e non ibridizzato. Gli ampliconi prodotti vengono fatti ibridare con una sonda specifica, complementare, di DNA a singola elica, marcata con esteri di acridinio. La sonda ibridizza e l'estere di acridinio si intercala nella doppia elica, risultando quindi protetto, grazie alla conformazione assunta dal doppio filamento di acido nucleico, dall'azione idrolitica di un apposito reagente. Il marcatore della sonda non legata, non interca-

landosi, risulta invece esposto all'azione dell'agente di idrolisi e può essere facilmente distrutto: la marcatura sui filamenti singoli è di conseguenza inattivata (51).

La rilevazione degli ibridi marcati RNA-DNA si ottiene utilizzando un luminometro. L'intera sequenza di amplificazione e rilevazione che avviene in un'unica provetta, non necessita di fasi di lavaggio e si completa in circa tre ore.

Il test MTD apporta vantaggi tecnologici e clinici, rispetto ai tradizionali test di biologia molecolare:

- Migliore affidabilità per l'uso, come bersaglio, di r-RNA batterico: dato che l'r-RNA è presente in migliaia di copie in ogni cellula batterica, la probabilità di iniziare l'amplificazione è in effetti più elevata di quando è scelta come bersaglio una singola copia di DNA. Ciò costituisce un importante vantaggio quando i Micobatteri sono presenti in piccolo numero in un campione
- Amplificazione esponenziale in tempi brevi ad un'unica temperatura
- Produzione di ampliconi di r-RNA primario: l'r-RNA prodotto nel corso dell'amplificazione è più labile nell'ambiente rispetto al DNA sintetizzato in altri metodi di amplificazione. Il rischio di contaminazione del Laboratorio ed il numero di falsi positivi sono sostanzialmente ridotti
- Tutte le fasi del test avvengono in un'unica provetta e senza procedimenti di lavaggio; ciò minimizza ulteriormente il rischio di contaminazione e di falsi positivi.

## Identificazione

La differenziazione dei Micobatteri appartenenti al *M.tuberculosis* complex, dai Micobatteri non tubercolari (MOTT), è di fondamentale importanza dal punto di vista clinico e deve essere raggiunta il più rapidamente possibile. È necessario procedere all'identificazione di tutti i Micobatteri cresciuti in coltura. Per l'identificazione di *M.tuberculosis* sono disponibili diversi tipi di test:

- DNA-probe
- Test biochimico-colturali
- NAP (p-nitro- $\alpha$ -acetilamino- $\beta$ -idrossipropiofenone)
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Nell'identificazione con DNA-probe si impiegano sonde marcate costitui-

te da DNA a catena singola, complementare ad una sequenza nucleotidica del genoma batterico, che è specie-specifica (r-RNA 16S); qualora la sonda riconosca nel materiale genetico del microrganismo in esame, la sequenza complementare, dà luogo ad ibridizzazione. La marcatura è realizzata con molecole chemioluminescenti che, una volta eccitate, emettono radiazioni luminose, rilevabili con un luminometro, consentendo il riconoscimento dell'ibrido formatosi e quindi l'identificazione del microrganismo (51).

**Test biochimici:** sono state eseguite prove biochimiche per evidenziare l'attività metabolica delle specie di Micobatteri non tipizzabili con i DNAProbes.

**NAP-test:** è una prova di inibizione selettiva effettuata con i terreni liquidi utilizzati con il metodo radiometrico BACTEC 460 TB. Il NAP (para-n-acetilazione-p-idrossi-propiofenone) è capace di inibire lo sviluppo delle specie appartenenti al genere *M. tuberculosis* complex mentre è tollerato dai Micobatteri non tubercolari. Incubando in parallelo e leggendo giornalmente due brodoculture radiometriche, una sola delle quali addizionata con NAP, è possibile evidenziare, nel giro di 4-5 giorni, che l'incremento del "growth index" (GI) dei ceppi appartenenti al *gruppo M.tuberculosis complex* si verifica esclusivamente nel flacone privo di NAP (57).

**HPLC:** è utile per separare ed identificare gli acidi micolici, presenti nella parete cellulare dei Micobatteri, a catena lunga di 70-100 atomi di carbonio; ha la stessa portata del sequenziamento genico.

## Test di sensibilità ai farmaci

I test di sensibilità *in vitro* per il bacillo tubercolare rispondono a tre esigenze particolari (25):

- Servono come guida alla scelta della terapia
- Aiutano a confermare il sospetto clinico di una resistenza, orientando verso i farmaci alternativi più idonei
- Possono essere usati per stimare la prevalenza in una comunità delle resistenze primarie o acquisite.

Nel determinare la sensibilità agli antibiotici si deve tener conto di due principi. In primo luogo, la resistenza spontanea dei microrganismi è indipendente dall'esposizione al farmaco. In secondo luogo, dall'osservazione empirica si ricava una correlazione tra la risposta clinica *in vivo* ad un farmaco antiMicobatterico ed il risultato dei test di sensibilità *in vitro*: quando in una popolazione Micobatterica è presente più dell'1% di mutanti, resistenti ad un

determinato farmaco, la terapia con quel farmaco sarà inutile, in quanto la percentuale suddetta di mutanti resistenti è destinata ad aumentare rapidamente per effetto della pressione selettiva esercitata dalla terapia stessa (22).

La sensibilità del *M.tuberculosis* complex ai farmaci antitubercolari può essere saggiata usando alcune metodiche come quella delle proporzioni, delle concentrazioni assolute e del rapporto di resistenza (resistance-ratio).

Recentemente è stato messo a punto il saggio di sensibilità ai farmaci antiMicobatterici maggiori con il sistema MGIT. Con una sospensione Micobatterica standardizzata si inocula una serie di provette MGIT addizionate con le opportune concentrazioni dei singoli farmaci, nonché una provetta MGIT di controllo, senza farmaci. Le provette vengono incubate e lette giornalmente per rilevare l'eventuale sviluppo di fluorescenza. La comparsa di fluorescenza in una provetta contenente antibiotico, entro tre giorni dalla positivizzazione della provetta di controllo, indica che il ceppo è da considerarsi resistente (46).

Ad oggi è anche disponibile un Sistema automatizzato (Sistema MGIT) per il saggio della positività ai farmaci che permette l'interpretazione automatica dell'antibiogramma. Tale Sistema incuba e rivela in automatico l'eventuale crescita nei tubi antibiotati; in caso di crescita nel tubo di controllo il Sistema interpreta e referta automaticamente i risultati di sensibilità o resistenza del ceppo nei confronti degli antibiotici testati. Permette di saggiare almeno due concentrazioni per molecola di antibiotico. L'antibiogramma di routine si esegue su quattro molecole: Streptomina, Isoniazide, Rifampicina ed Etambutolo. In caso di resistenza alle basse concentrazioni di Streptomina, Isoniazide o Etambutolo si saggiano le alte concentrazioni. Le concentrazioni critiche sono riportate in Tabella 12.

Per ogni batteria di antibiotici viene allestito un controllo di crescita avente concentrazione di inoculo di 1/100 rispetto a quella dei tubi antibiotati. I risultati ottenuti sono pertanto paragonabili a quelli del metodo proporzionale.

ANTIBIOTICO	CONC. BASSA	CONC. ALTA
Streptomina	1.0 µg/ml	4.0 µg/ml
Isoniazide	0.1 µg/ml	0.4 µg/ml
Etambutolo	5.0 µg/ml	7.5 µg/ml

**Tabella 12. Concentrazioni critiche.**

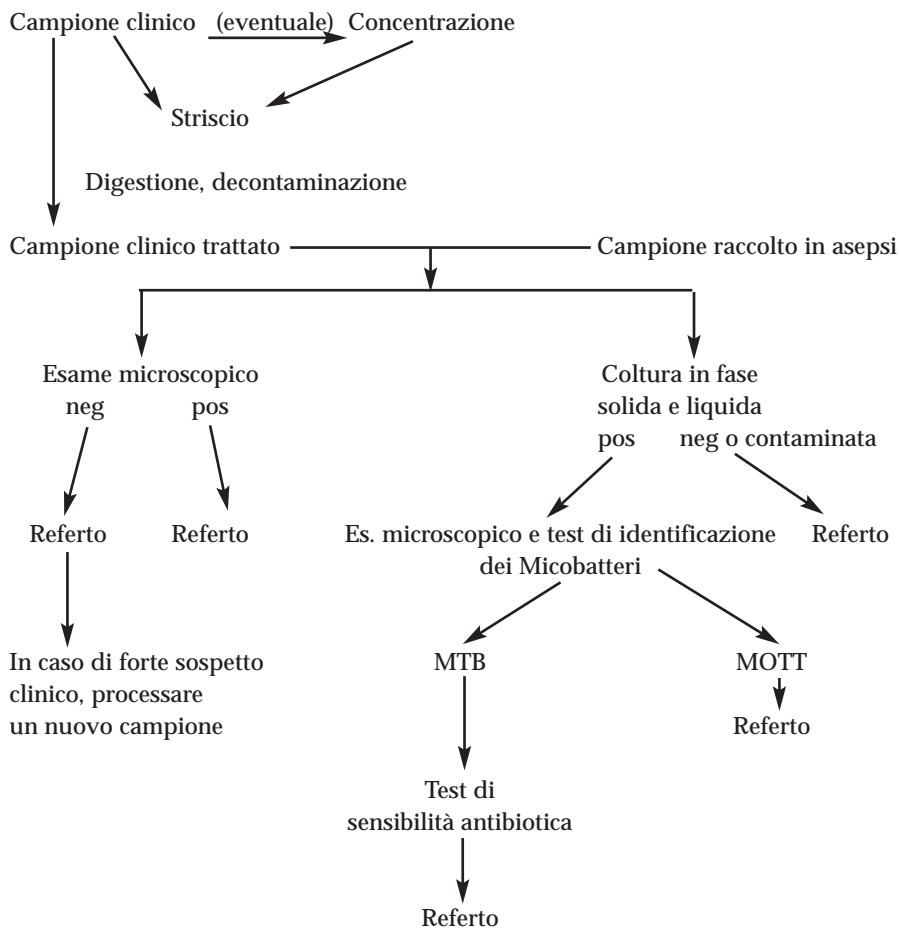
## Procedura diagnostica per l'accertamento dell'infezione da *M. tuberculosis*

- Sospetto → Clinica\*:
  - o Esame clinico (sintomi: tosse, perdita di peso, febbre, ecc...)
  - o Test cutaneo
  - o Esame radiografico del torace
- Diagnosi → Laboratorio:
  - o Concentrazione, decontaminazione e digestione del campione
  - o Esame microscopico
  - o Coltura (solida e liquida)
  - o Identificazione e speciazione
  - o Suscettibilità agli antibiotici
- Terapia:
  - o Monitoraggio

---

\* Il contesto in cui si opera, durante la diagnosi Micobatterologica, deve essere chiaro anche dal punto di vista clinico, per dare fondatezza ai metodi di indagine applicati ed ai risultati ottenuti.

## Micobatteri: algoritmo della diagnosi attuale di Laboratorio



## **Microchip per identificazione e studio resistenza di *M.tuberculosis***

La possibilità di concentrare in un unico strumento numerose indagini genetiche, apre nuove prospettive a quesiti diagnostici caratterizzati da un numero elevato di variabili.

La tecnologia microarray elettronico (Nanogen) si presta ad essere impiegata sia nell'identificazione dei Micobatteri, in quanto è estremamente accurata ed altamente versatile, che al rilevamento di tutte le mutazioni note per essere associate a resistenza ai farmaci nel bacillo tubercolare. Anche se si tratta per il momento solo di ipotesi di studio, le prospettive che sembrano aprirsi appaiono interessanti, in primo luogo per l'accorciamento dei tempi diagnostici (56).

## **Terapia antitubercolare**

La terapia deve avere per obiettivo la guarigione delle persone trattate; questo risultato deve essere conseguito limitando quanto più possibile l'insorgenza e la diffusione di resistenze ai farmaci antimicrobici e nel modo più efficiente possibile (40).

I farmaci antitubercolari utilizzati oggi sono: Isoniazide, Rifampicina, Pirazinamide, Streptomina, Etambutolo, in diverse combinazioni tra loro per la terapia di "attacco" e la successiva terapia di mantenimento.

E' competenza del Clinico decidere la terapia più idonea in base a dettagliate informazioni raccolte sulla base degli esami e della storia clinica del paziente. Il trattamento con farmaci antitubercolari, una volta iniziato, va seguito scrupolosamente e va accompagnato da esami di controllo che forniscono ulteriori informazioni sull'andamento del processo di guarigione o su eventuali necessità di cambiamento della terapia.

La terapia dovrebbe essere iniziata presso gli ambulatori specialistici o in regime di ricovero ospedaliero per i casi più complessi o più gravi. E' necessario che il paziente resti in contatto con la struttura che ha prescritto la terapia, per i successivi controlli.

La terapia può durare dai 6 mesi ai 18-24 mesi.

Per evitare che si instauri una resistenza ai farmaci antitubercolari, l'OMS e le Associazioni scientifiche hanno studiato una strategia chiamata DOT, dalle lettere iniziali delle parole inglesi che significano Terapia Osservata



Direttamente (Directly Observed Therapy). La DOT è, appunto, quel regime di terapia in cui un sanitario si assicura che il paziente assuma la sua dose di farmaci ogni giorno.

Con questo tipo di trattamento terapeutico, seguito “diligentemente”, il periodo di cura della TBC dura circa 6 mesi.

Introdotta negli anni '90, la DOT è considerata, attualmente, uno dei metodi più efficaci per curare la TBC e per evitare l'insorgenza della resistenza agli antibiotici (sito internet del Ministero della Salute “Materiale tecnico informativo predisposto e distribuito dal Ministero della sanità - Dipartimento della Prevenzione - Ufficio III”).

Recenti studi hanno dimostrato una riduzione dei tassi di incidenza di tubercolosi ed un decremento nell'isolamento di ceppi resistenti con un significativo aumento della percentuale di guarigione nei Paesi che hanno adottato programmi di DOT (40).

## Ospedalizzazione

Esiste ampia evidenza scientifica che la tubercolosi possa essere trattata con successo ambulatorialmente anche nella fase intensiva e con il paziente escreato positivo.

Oggi l'ospedalizzazione, in isolamento respiratorio, è quindi riservata a casi particolari:

- o Condizioni cliniche gravi
- o Scarsa compliance alla terapia
- o Fallimento terapeutico
- o Patologie associate gravi
- o Effetti collaterali gravi
- o Presenza di multiresistenza
- o Gravi condizioni socio-economiche scadute.

## Conclusioni

Condurre una diagnosi tempestiva di Tubercolosi, su campioni respiratori ed extrapolmonari, è di cruciale importanza, per le sue implicazioni epidemiologiche, terapeutiche e di Sanità Pubblica. Quando esiste un sospetto clinico di infezione da *M.tuberculosis*, la diagnosi di Laboratorio rapida ed affidabile è una necessità, non soltanto clinica, a beneficio del paziente, ma anche epidemiologica, a vantaggio dell'intera comunità. La possibilità di validare in breve tempo la diagnosi, conoscendo la specie e la sensibilità farmacologica dei Micobatteri isolati, permette infatti di istituire una terapia tempestiva e specifica, nonché di porre in atto le misure di contenimento della diffusione della malattia.

## Bibliografia

1. Abe C., Hirano K., Wada M., Kazumi Y., Takahashi M., Fukasawa Y., Yoshimura T., Miyagi C., Goto S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 3270-3274.
2. Barbuti S., Bellelli E., Fara G.M., Giammanco G. Igiene e medicina preventiva, Bologna, Monduzzi Ed., 1995; 221-234.
3. Bergmann J.S., Yuoh G., Fish G., Woods G.L. Clinical evaluation of the enhanced Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for rapid diagnosis of tuberculosis in prison inmates. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 1419-1425.
4. Bisi R., Bonato C., Vaiani R. Una diagnosi rapida e affidabile. *Esa System trimestrale di medicina di Laboratorio*, 1996, anno V; 3: 24-27.
5. Brock T.D., Madigan M.D., Martinko J.M., Parker J. *Microbiologia*, Milano, Città Studi Edizioni, 1996; 106-108.
6. Callegaro A. Tecniche di amplificazione genica. *Quaderni di Microbiologia Clinica: Micobatteriologia*, Milano, Biomedica, 1999; 75-86.
7. Cambau E., Truffot-Pernot C., Boulahbal F., Wichlacz C., Grosset J., Jarlier V. Mycobacterial Growth Indicator Tube versus the proportion method on Löwenstein-Jensen Medium for antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2000; 19: 938-942.
8. Campora U. La Tubercolosi; dal Sito Internet [www.Tbcugo.htm](http://www.Tbcugo.htm)
9. Cassone A. et al. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità 1996; 9 (11); dal Sito Internet [www.iss.it](http://www.iss.it)
10. Cassone A. TBC: un'emergenza mondiale. *Esa System trimestrale di medicina di Laboratorio*, 1996, anno V; 3: 4-8.
11. Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza, Promozione della Salute, ISS, Sito Internet [www.epicentro.iss.it](http://www.epicentro.iss.it)
12. Chiaradonna P., Natili S, Oliverio R.M., Tronci M, Sorrentino R, Utilizzo di un nuovo test su sangue intero per la diagnosi di infezione da M . Tuberculosis., in "Microbiologia Medica" AMCLI 2005, XXXIV Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Roma Ottobre 2005, volume 20, n° 3 .
13. Comitato Scientifico di Pneumonet "La causa della malattia Tuberculare", dal Sito Internet: [www.pneumonet.it](http://www.pneumonet.it)
14. Costa Angeli M., Agenti infettanti, dal sito [www.chirurgiatoracica.org](http://www.chirurgiatoracica.org)
15. Debbi A, Losi M., Luppi F., Cerri S., Fabbri L. M., Richeldi L. , "Nuovi

- strumenti per la diagnosi di infezione tubercolare latente”, in rassegna di patologia dell'apparato respiratorio 2003, 18: 482:487.
16. De Cal F. Aspetti socioeconomici correlati all'identificazione rapida di *M.tuberculosis*. Esa System trimestrale di medicina di Laboratorio, 1996, anno V; 3: 28-30.
  17. Ehlers S., Ignatius R., Regnath T., Hahn H. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. Journal of Clinical Microbiology, 1996; 34 (9): 2275-2279.
  18. Fanti F., Conti S., Zannino T., Polonelli L., Dettori G., Chezzi C. Micobatteri isolati presso l'Istituto di Microbiologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Parma nel triennio 1994-1996. Bollettino di Microbiologia e Indagini di Laboratorio news 1997; 3 (1-2): 9-14.
  19. 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 *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and non-respiratory specimens. Journal of Clinical Microbiology 1998; 36 (3); 684-689.
  20. Girardi E. Epidemiologia della Tubercolosi in Italia in “Microbiologia Medica” AMCLI 2004, XXXIII Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Padova 8-11 Giugno 2004, volume 19, n° 2 , anno 2004.
  21. Gurnari F. La Tubercolosi; da [www.pneumo-online.com](http://www.pneumo-online.com)
  22. Koneman E.W., Allen S.D., Dowell Jr. V.R., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn Jr W.C. Atlante di Microbiologia Diagnostica, Roma, Antonio Delfino Editore, 1994; 637-682.
  23. Lacchini C., Mandler F. Micobatteri e patologia clinica. Atti del 19° Convegno delle Sezioni Liguri AMCLI e SIMMOC: Aspetti microbiologici e clinici delle infezioni da Micobatteri, Genova 1999; 69-83.
  24. LoBue P.A., Catanzaro A. TB or not TB? Rapid tests for pulmonary tuberculosis. The Journal of Respiratory Diseases 1997; 18 (3):299-308.
  25. Mandler F., Passerini Tosi C., Scarparo C., Tortoli E., Piersimoni C. e il Comitato AMCLI per lo Studio dei Micobatteri (CoSMic). Proposta di linee-guida per la diagnosi microbiologica della Tubercolosi. Microbiologia Medica 1999; 14 (4): 313-330.
  26. Mantellini P.V., La Tubercolosi come malattia socioeconomica. Atti del 19° Convegno delle Sezioni Liguri AMCLI e SIMMOC: Aspetti microbiologici e clinici delle infezioni da Micobatteri, Genova 1999; 3-34.
  27. Mascellino M.T. Esame culturale. Quaderni di Microbiologia Clinica: Micobatterologia, Milano, Biomedica, 1999; 21-38.
  28. Marchetti D. La diagnostica dei Micobatteri in Europa, in “Microbiologia

- Medica” AMCLI 2004, XXXIII Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Padova 8-11 Giugno 2004, volume 19, n° 2 , anno 2004.
29. Molinari G.L., Andreoni S., Crespi I., Camaggi A., Moggia G., Fortina G. Isolamento di Micobatteri presso l'Ospedale Maggiore di Novara negli anni 1994-2000. *Microbiologia Medica* 2001; 16 (3): 344-348.
  30. Moro M.L. Aspetti epidemiologici della Tubercolosi. Atti del convegno: Malattie infettive riemergenti, Firenze-Roma 1995; 56-59.
  31. Moroni M., Rossi C., Marchetti G., Pranzetti F., Gori A. AIDS e Tubercolosi: un binomio sempre più stretto. *Esa System trimestrale di medicina di Laboratorio*, 1996, anno V; 3: 18-23.
  32. Nicoletti G., Nicolosi V.M. Dizionario di batteriologia umana. Normale e patologica, Salerno, Momento Medico, 1998; 230-247.
  33. OMS, Allarme OMS per la Tubercolosi in Africa e in Europa, 24 Marzo 2005, dal Sito Internet [www.cittadellascienza.it](http://www.cittadellascienza.it)
  34. Passerini-Tosi C. Raccolta e conservazione dei campioni. Quaderni di Microbiologia Clinica: Micobatteriologia, Milano, Biomedica, 1999; 11-16.
  35. Peduzzi R., Michelini V., Pagano E. Infezioni da Micobatteri dal punto di vista di un laboratorio di microbiologia in “Biologi Italiani”, Giugno 2004.
  36. Pfyffer G.E., Cieslak C., Welscher H.M., Kissling P., Rush-Gerdes S. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35 (9): 2229-2234.
  37. Pfyffer G.E., Kissling P., Jahn E.M.I., Welscher H.M., Salfinger M., Weber R. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996; 34 (4): 834-841.
  38. Piersimoni C. Esame microscopico. Quaderni di Microbiologia Clinica: Micobatteriologia, Milano, Biomedica, 1999; 17-20.
  39. Piersimoni C. La diagnostica delle infezioni da Micobatteri in Italia: lo stato dell'arte, in “Microbiologia Medica” AMCLI 2004, XXXIII Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Padova 8-11 Giugno 2004, volume 19, n° 2 , anno 2004.
  40. Piersimoni C., Zitti P., Cimarelli M.E., Nista D., De Sio G. Clinical utility of Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test compared with smear and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection* 1998; 4 (8): 442-446.
  41. Regione Lombardia, Deliberazione n° VII/19767 del 10/12/04, “Attuazione della D.C.R. 13 Marzo 2002, n° VII/462 Piano Socio Sanitario Regionale 2002-2004.
  42. Regione Piemonte, Assessorato alla Sanità Direzione Sanità Pubblica

- “Protocollo per la prevenzione e il controllo della Tubercolosi umana in Piemonte”, 1998.
43. Rüsç-Gerdes S., Domehl C., Nardi G., Gismondo M.R., Welscher H.M., Pfyffer G.E. Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37 (1): 45-48.
  44. Russo C., Gobbi S., Menichella D., Valutazione di un nuovo metodo di rivelazione di inf\_ in risposta all'infezione da *Mycobacteriu tuberculosis* nella popolazione pediatrica, in “Microbiologia Medica” AMCLI 2005, XXXIV Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Roma Ottobre 2005, volume 20, n° 3.
  45. Saddi M., Palchykovska, L.I., Borgna R., Kostina V.G., Chisu L., Soru A., Shestakova T.S., Magnapane S., Alexeeva I.V., Saddi B., Shved A.D., De Logu, Derivati fenazinici come potenziali agenti per il trattamento delle infezioni sostenute da M. tuberculosis resistenti e multiresistenti, in “Microbiologia Medica” AMCLI 2005, XXXIV Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Roma Ottobre 2005, volume 20, n° 3.
  46. Salamina G. La Tubercolosi: screening e misure preventive. Atti del convegno: Malattie infettive riemergenti, Firenze-Roma 1995; 83-87.
  47. Salfinger M., Pfyffer H.E. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1994; 3: 961-979.
  48. Scarparo C., Piersimoni C. Test di sensibilità. Quaderni di Microbiologia Clinica: Micobatteriologia, Milano, Biomedica, 1999; 55-74.
  49. Scarparo C. La diagnostica delle infezioni da Micobatteri nel Veneto: il passato ed il presente. La standardizzazione della diagnostica e la razionalizzazione delle risorse, in “Microbiologia Medica” AMCLI 2004, XXXIII Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Padova 8-11 Giugno 2004, volume 19, n° 2 , anno 2004.
  50. Scarpellini P., Braglia S. Micobatteri sempre più resistenti. *Esa System trimestrale di medicina di Laboratorio*, 1996, anno V; 3: 12-17.
  51. Smith M.B., Bergman J.S., Onoroto M., Mathews G., Woods G.L. Evaluation of the enhanced amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 1999; 123: 1101-1103.
  52. Soini H., Musser J.M. Molecular Diagnosis of Mycobacteria. *Clinical Chemistry* 2001; 47 (5): 809-814.
  53. Tortoli E. Identificazione. Quaderni di Microbiologia Clinica: Micobatteriologia, Milano, Biomedica, 1999; 39-54.
  54. Tortoli E. La rivincita dei Micobatteri. *Esa System trimestrale di medicina di Laboratorio*, 1996, anno V; 3: 9-11.

55. Tortoli E. Metodi di laboratorio per la diagnosi di Tubercolosi e Micobatteriosi. Atti del 19° Convegno delle Sezioni Liguri AMCLI e SIM-MOC: Aspetti microbiologici e clinici delle infezioni da Micobatteri, Genova 1999; 35-68.
56. Tortoli E. Linee guida e requisiti minimi per i laboratori di riferimento a livello regionale e nazionale, in "Microbiologia Medica" AMCLI 2004, XXXIII Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, Padova 8-11 Giugno 2004, volume 19, n° 2 , anno 2004.
57. Tortoli E., Bernabini S., Mariottini A., Torricelli F. Impiego di microchip per l'identificazione dei Micobatteri e per lo studio della resistenza ai farmaci del *Mycobacterium tuberculosis*, Ligandassay, 2004, 9:12-17.
58. Van Griethuysen A.J., Jansz A.R., Buiting A.G.M. Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB System, Septi-Chek AFB System and Löwenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria. Journal of Clinical Microbiology 1996; 34 (10): 2391-2394.
59. Varnier E. O., Il Bacillo tubercolare: ceppi multiresistenti. Novità in campo diagnostico ieri e oggi. In Microbiologia update 2002.
60. Walters S.B., Hanna B.A. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and Rifampin by Mycobacterium Growth Indicator Tube method. Journal of Clinical Microbiology 1996; 34 (6): 1565-1567.
61. Watson J. Improved surveillance of tuberculosis, in Euro surveillance, vol. 5, n° 4, Aprile 2000.
62. Wayne L.G., Kubica G.P. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Baltimore USA, Williams & Wilkins, 1986; 1436-1457.
63. Zanetti S., Ardito F., Sechi L., Sanguinetti M., Molicotti P., Delogu G., Pinna M.P., Nacci A., Fadda G. Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 1997; 35 (8): 2072-2075.



## Indice

Editoriale .....	pag. 3
Introduzione .....	» 5
Classificazione e caratteristiche dei Micobatteri .....	» 8
.M. africanum .....	» 13
.M. bovis .....	» 13
.Micobatteri atipici o non tubercolari .....	» 13
Sorgenti di infezione e modalità di trasmissione .....	» 14
Patogenesi ed immunità .....	» 15
Test tubercolinici .....	» 18
.Test di Mantoux .....	» 18
.Test multipuntura .....	» 19
Nuovi strumenti per la diagnosi di Tubercolosi .....	» 20
.Uso dei nuovi test per la diagnosi di Infezione Tubercolare latente ...	» 21
.Uso dei nuovi test per la diagnosi di Infezione Tubercolare attiva ...	» 21
Epidemiologia .....	» 22
Popolazioni sensibili .....	» 24
.I poveri .....	» 24
.Gli immigrati .....	» 24
.Gli anziani .....	» 25
.I malati di AIDS .....	» 25
.Altri gruppi a rischio .....	» 26
Multiresistenza .....	» 27
.Meccanismi di resistenza .....	» 28
Metodi di Laboratorio per la diagnosi di Tubercolosi .....	» 29
Raccomandazioni generali per la raccolta dei campioni .....	» 29
Preparazione e trattamento dei campioni .....	» 31
Decontaminazione-digestione .....	» 32

Centrifugazione .....	» 33
Esame microscopico .....	» 34
.Punti di attacco della microscopia .....	» 35
.Sensibilità della microscopia .....	» 35
.Specificità della microscopia .....	» 36
.Preparazione dello striscio .....	» 37
Colorazione .....	» 37
.Colorazione di Ziehl-Neelsen (carbolfucsina a caldo) .....	» 38
.Colorazione di Kinyoun (carbolfucsina a freddo) .....	» 39
.Colorazione con auramina .....	» 40
Controllo di qualità .....	» 42
Osservazione e refertazione .....	» 42
Esame colturale .....	» 43
.Terreni solidi .....	» 43
.Terreni liquidi .....	» 45
Tecniche di amplificazione genica .....	» 47
Identificazione .....	» 50
Test di sensibilità ai farmaci .....	» 51
Procedura diagnostica per l'accertamento dell'infezione da	
M. tuberculosis .....	» 53
.Micobatteri: algoritmo della diagnosi attuale di Laboratorio .....	» 54
Microchip per identificazione e studio resistenza di M.tuberculosis ..	» 55
Terapia antitubercolare .....	» 55
Ospedalizzazione .....	» 56
Conclusioni .....	» 57
Bibliografia .....	» 58
Indice .....	» 63

# Caleidoscopio

Italiano

... 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  $\beta$ -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 enzimologico 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. Caffero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina 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: patogenesi 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'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterin 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 Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-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 streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento 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.: *Immunoflogosi 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., Barucci 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 (I)*. 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 I*. Novembre '98.
- 127.Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II)*. Dicembre '98.
- 128.Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunostochimica*. Gennaio '99.
- 129.Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.
- 130.Castello G., Silvestri I.: *Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.
- 131.Aiello V., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata*. 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., Bonferraro 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.: *AllergoGest*. Settembre 2000.
146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: *TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici*. Gennaio 2001.
147. Rasso 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 screening, 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 infiammatorie 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., Mazzaello 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  $\beta$ -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. Magri 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 Tubercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.



170. Aebischer T.: *Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*. Settembre 2003.
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: *Il manuale della sicurezza*. Ottobre 2003.
172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione*. Novembre 2003.
173. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: *Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee*. Dicembre 2003.
174. Savron G.: *Le Fobie*. Gennaio 2004.
175. Paganetto G.: *Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*. Febbraio 2004.
176. Giovanella L.: *Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*. Marzo 2004.
177. Severino G., Del Zompo M.: *Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata"*. Aprile 2004.
178. Arigliano P.L.: *Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie*. Maggio 2004.
179. Bruni A.: *Malattia di Alzheimer e Demenza Frototemporale*. Giugno 2004.
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: *Eziopatogenesi e diagnostica allergologica*. Luglio 2004.
181. Franzoni E., Gualandi P., Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare*. Agosto 2004.
182. Grandi G., Peyron F.: *La toxoplasmosi congenita*. Settembre 2004.
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A.: *Patogeni emergenti e resistenze batteriche*. Ottobre 2004.
184. Tosello F., Marsano H.: *Scientific English Handout*. Novembre 2004.
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: *Iperensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
186. Paganetto G.: *Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*. Gennaio 2005.
187. Savron G.: *La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*. Febbraio 2005.
188. Magrì G., Baghino E., Florida M., Ghiara F.: *Leishmania*. Marzo 2005.
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., Pasina L.: *Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: *Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*. Maggio 2005.
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonese G.: *Aerobiologia ed allergopatie*. Giugno 2005.
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.: *Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12*. Luglio 2005.
193. Zepponi E.: *Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*. Settembre 2005.
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: *La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi*. Ottobre 2005.
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: *Doping e antidoping nello sport*. Novembre 2005.
196. Lozzi M.: *La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*. Dicembre 2005.

197. Bracco G.: *Progettare un Laboratorio di Analisi*. Gennaio 2006.
198. Commissione Tecnica sul Rischio Clinico: *Risk management in Sanità. Il problema degli errori*. Febbraio 2006.
199. Angelucci A.: *Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*. Marzo 2006
200. Casati G., Marchese E., Roberti V., Vichi M.C.: *La gestione dei processi clinico assistenziali per il miglioramento delle prassi*. Aprile 2006.
201. Zanella D., Ceretta M., Orso Giaccone G.: *Peptidi natriuretici: nuove frontiere in cardiologia?* Maggio 2006.
202. Cicala M., Dal Lago U., Vinci P., Maggiorotti M.: *L'accusa di malpractice in ambito medico*. Giugno 2006.
203. Martino R.: *Manuale Qualità UNI EN ISO 9001*. Luglio 2006.
204. Mazzarello M.G., Arata M., Perfumo M., Marchese A., Debbia E.A.: *Tubercolosi e micobatteri*. Settembre 2006.



I volumi disponibili su Internet nel sito [www.medicalsystems.it](http://www.medicalsystems.it) sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del Caleidoscopio che ormai sono “storiche”. Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: Caleidoscopio 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

**Caleidoscopio**  
**Rivista mensile di Medicina**  
anno 24, numero 204

**Direttore Responsabile**

Sergio Rassa  
Tel. mobile 338 2202502  
E-mail: sergiorassa@libero.it

**Progettazione e Realizzazione**



Restless Architect  
of Human Possibilities s.a.s.

**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

**Responsabile Ufficio Acquisti**

Giusi Cunietti

**Segretaria di Direzione**

Maria Speranza Giola

**Servizio Abbonamenti**

Maria Grazia Papalia  
Flavio Damarciasi

**EDITORE**

... il futuro ha il cuore 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<sup>®</sup>, Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

**Stampa**

Tipolitografia Nuova ATA

Via Gelasio Adamoli, 281 - Genova

Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - [info@nuovaata.com](mailto:info@nuovaata.com) - [www.nuovaata.com](http://www.nuovaata.com)

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996

Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Settembre 2006

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



## ***Prossimi Corsi ECM***

- 2-12-2006 Nutrizione ed intolleranze alimentari. Acqui (AL)
- 24-11-2006 La Qualità nel Laboratorio Analisi. I costi della non Qualità. Bologna
- 18-11-2006 Le tiroiditi Arezzo
- 17-11-2006 Nuovi esami di laboratorio per la cardiologia. Giaveno (TO)
- 14-11-2006 Il controllo di gestione in una azienda sanitaria. Avellino
- 14-11-2006 Marcatori cardiaci: passato, presente e futuro. Adria (RO)
- 10-11-2006 Comunicazione corretta ed efficace con l'utilizzo dei modelli comunicativo relazionali in sanità. Casarano (LE)
- 10-11-2006 Il supporto clinico e laboratoristico nella diagnostica delle patologie cardiache. Milano
- 9-11-2006 Sviluppo di una Cultura gestionale con la creatività e la capacità di soluzione dei problemi. Taranto
- 8-11-2006 Parlare in pubblico ed arte oratoria per le presentazioni Congressuali in Medicina. Bari
- 8-11-2006 VEQ - la valutazione di qualità che produce qualità. Vibo Valentia
- 7-11-2006 Sviluppo di una Cultura gestionale con la creatività e la capacità di soluzione dei problemi. Giovinazzo (BA)
- 7-11-2006 La Qualità nel Laboratorio Analisi. La gestione per processi. Acqui (AL)
- 6-11-2006 Comunicazione corretta ed efficace con l'utilizzo dei modelli comunicativo relazionali in sanità. Terlizzi (BA)
- 2-11-2006 Affezione e buona motivazione al lavoro in ambito sanitario. Catania
- 31-10-2006 Affezione e buona motivazione al lavoro in ambito sanitario. Messina
- 30-10-2006 Cultura della Qualità e costi della "Non Qualità" in ambito sanitario. Messina

*Sponsor Ufficiale*

*... il futuro ha il cuore antico*

**MEDICAL SYSTEMS S.p.A.**



Safari Archivio Composizione Vista Cronologia Preferiti Finestra Aiuto

Benvenuti in Medical Systems S.p.A.

http://www.medicalsystems.it/

HOME | AZIENDA | CONTATTI | NEWS

# MEDICAL SYSTEMS S.p.A.

di frontiera per il nuovo testatore

SERVIZI | PRODOTTI | ANALIZZATORI | REAGENTI | SOFTWARE | CORSI | EVENTI ECM | EDITORIA | PDI

### DISTRIBUZIONI ESCLUSIVE PER L'ITALIA DPC

**DPC** DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION

Medical Systems offre una vasta gamma di soluzioni per la gestione del Laboratorio Analitico. I nostri strumenti più di linea predefinita (Point of Care) e sistemi integrati agli analizzatori per l'immunochimica e la Chimica Clinica, il software.

### CORSI

Conoscere le ultime tecnologie e le metodologie analitiche, apprendere sulle più recenti soluzioni di legge e di mercato, mettersi alla prova con i simulatori, valutare il personale, ottenere il certificato di idoneità, conoscere le metodologie e le procedure.

es.dnt@msf.it

### PRODOTTI IMMUNOMETRICI

In questo settore è necessario strumenti efficienti, economici, precisi, a basso costo, che siano in grado di gestire un alto volume di analisi.

- ✓ **METODICHE**
- ✓ **SCHIVI DI SICUREZZA**
- ✓ **ELIMIO ALLERGENI**

### EVENTI ECM

Partecipare ai più importanti congressi, seminari, workshop, conferenze, corsi di aggiornamento, corsi di perfezionamento, corsi di specializzazione, corsi di aggiornamento, corsi di perfezionamento, corsi di specializzazione.

es.dnt@msf.it

### SOFTWARE PER LA GESTIONE DEL LABORATORIO D'ANALISI

IL NOSTRO SOFTWARE DI GESTIONE DEL LABORATORIO ANALITICO (LIS) è in grado di gestire un alto volume di analisi.

- ✓ **DIAGNOSI**
- ✓ **PRELIEVI**
- ✓ **REALTIME SERVICE**

### EDITORIA SCIENTIFICA PER LA PROPRIA CLIENTELA

Il nostro editore offre una vasta gamma di pubblicazioni scientifiche, riviste, manuali, atlanti, guide, etc.

- ✓ **CALENDARIO**
- ✓ **CLASS**
- ✓ **BRISA IMMUNITA'**
- ✓ **PARADIGMA**
- ✓ **DIRA CITATI PER AIDS**

### PREANALITICA

Conoscere le ultime tecnologie e le metodologie analitiche, apprendere sulle più recenti soluzioni di legge e di mercato, mettersi alla prova con i simulatori, valutare il personale, ottenere il certificato di idoneità, conoscere le metodologie e le procedure.

es.dnt@msf.it

**- IgG Allergene Specifiche!!!**

**- NT-ProBNP!!!**

Medical Systems S.p.A. - Via. Via. Torino, 25 - 00198 Roma - Tel. 06.52441 - 44.44.44.44

In caso di mancato recapito, pregasi ritornare al mittente che pagherà la tassa dovuta.



€ 10,33