

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	-Esame colturale per la ricerca del bacillo di Koch -Esame diretto per la ricerca di BAAR	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1- Principio del Test

Semina del materiale biologico , dopo opportuna decontaminazione ed eventuale fluidificazione, in opportuni terreni liquidi o solidi per l'isolamento dei micobatteri e in particolare del micobatterio della tubercolosi o bacillo di Koch (*Mycobacterium tuberculosis* complex).

2- Applicazione clinica

La tubercolosi costituisce ancora oggi nei paesi sviluppati, un importante problema di salute pubblica soprattutto fra gli immuno-depressi e gli immigrati. Il controllo e la prevenzione della tubercolosi non possono prescindere dall'apporto del laboratorio. Il laboratorio analisi infatti oltre a poter individuare la presenza dei micobatteri nei materiali biologici (già questo indice di malattia e di diffusibilità della stessa ad altri pazienti), è in grado di verificare l'efficacia dei trattamenti chemioterapici instaurati o da instaurare. Inoltre non si può ignorare la sempre maggiore diffusione delle specie batteriche non tubercolari (MOTT) , con quadri clinici particolari. Le specie di micobatteri non tubercolari hanno raggiunto oggi il numero di oltre 80. Per la tipizzazione dei vari ceppi di micobatteri non tubercolari si rimanda a centri di riferimento regionali. Il nostro laboratorio è in contatto con il C.R.R. dei micobatteri presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Careggi di Firenze. Nella ASL di L'Aquila (bacino di utenza di 100.000 abitanti) ci aspettiamo almeno 12 casi l'anno di tubercolosi microbiologicamente accertata, secondo nostre statistiche degli anni precedenti.

3- Campione

La ricerca può essere effettuata su qualunque materiale biologico , in quanto la tubercolosi può diffondersi in tutti i distretti dell'organismo. L'isolamento e la corretta tipizzazione di *Mycobacterium tuberculosis* complex pone diagnosi di tubercolosi. I micobatteri non tubercolari (tipizzati da un centro di riferimento esterno, come scritto sopra)

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

devono essere valutati alla luce della clinica: possono essere segno di semplice contaminazione, colonizzazione o, più raramente, di una micobatteriosi vera e propria. I micobatteri in genere sono presenti nel campione in numero poco numeroso. Pertanto, è generalmente consigliabile prelevare campioni (anche di espettorato) per più giorni successivi (3 giorni consecutivi).

3.1 Modalità di raccolta

Occorre usare i contenitori di plastica monouso sterile, con tappo a vite del tipo usato per le urinocolture. I tamponi sono da evitare. Se non si possono fare altri tipi di prelievo, si possono utilizzare tamponi provvisti di terreno di trasporto tipo Amies o Stuart. Il campione va inviato al laboratorio il più rapidamente possibile, per evitare la moltiplicazione di eventuali microrganismi contaminanti e per assicurare la sopravvivenza dei micobatteri.

Nella tabella si mostrano i principali campioni biologici per la ricerca dei micobatteri:

MATERIALE	QUANTITA'	N. DI CAMPIONI	NON CONFORMITA'
Aspirato gastrico	>5-10 mL raccolto al mattino a digiuno	3 campioni in giorni consecutivi	Campioni non neutralizzati con carbonato di sodio
Broncoaspirato, BAL (liquido di lavaggio bronchiale) e simili	> 5 mL		
Espettorato	5-10 mL raccolto al mattino	3 campioni in giorni consecutivi	Campioni francamente salivari
Espettorato indotto	5-10 mL raccolto al mattino	3 campioni in giorni consecutivi	
Feci	> 1 gr		Campioni congelati
Liquidi cavitari (pleurico, peritoneale, sinoviale)	5-10 mL preferibilmente con aggiunta di eparina		
Liquor	> 2 mL		
Materiali da ferite			Tamponi
Pus	La massima quantità possibile		Tamponi
Sangue	5-10 ml nelle apposite bottiglie del Bact/Alert	3 prelievi a distanza di 30 minuti l'uno dall'altro	
Urine	La prima urina del mattino (su contenitore da	3 campioni in giorni consecutivi	Urine delle 24 ore, urine da sacca

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

	urinocoltura).Almeno 40 ml		
--	-------------------------------	--	--

3.2 – Modalità di conservazione e trasporto

La conservazione avviene a 4°C per un massimo di 4 giorni., periodo nel quale è preservata la vitalità dei micobatteri. Il congelamento dei campioni è da evitare poiché può diminuire la carica dei micobatteri vitali. Per la spedizione dei campioni si devono seguire le modalità previste dalla circolare del ministero della Salute n. 16 del 20/07/94.

3.3 – Idoneità dei campioni

Campioni non idonei o in quantità insufficienti non dovrebbero essere processati (esempio urine raccolte in provette da 10 mL, quantità di espettorato scarso o francamente salivare ecc.), tamponi.

4- Standard, Controlli, Reagenti

Snap'n Digest (D.I.D)

Per la decontaminazione/fluidificazione usiamo il kit Snap 'n Digest . Il sistema impiega NaOH al 4% e N-acetil-L-cisteina .L'associazione NaOH –N-acetil-L-cisteina è considerato il metodo di riferimento per la fluidificazione /decontaminazione dei materiali biologici per la ricerca dei micobatteri.

Composizione del kit:

-Fiacone da 75 mL:

- 1) Citrato di sodio (0.1M) 2.9% 2) NaOH (idrossido di sodio) 4% -Componente liofilo: N-acetil-L-cisteina 0.375 gr/fiala

-Busta contenete tampone fosfato da sciogliere in 500 mL di acqua distillata sterile. Concentrazione finale: 0.0067M, pH=6.8

L'acetil cisteina è presente dentro una fiala di vetro perché una volta sciolto tende a trasformarsi in forma ossidata come cistina che ha un potere fluidificante nullo. La soluzione va usata entro 24 ore.

Prima dell'uso , allentare il tappo a vite del fiacone. Localizzare la fiala nel fiacone e premere la fiala in verticale fino a romperla. Agitare delicatamente per sciogliere l'acetil cisteina.

Carbol fuchsin solution Accustain (Sigma)

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

1)Pararosaniline (0.85%) , 2) Phenol (2.5%), 3)Glicerol (5%), 4) DMSO (5%), 5) Etanol (5%)

Il fenolo agisce come mordenzante, cioè favorisce la penetrazione della fucsina.Stessa funzione ha il calore.

Acido cloridrico 37% (12 N)

Etanolo

Flaconi MP

Per l'esame colturale usiamo bottiglie contenenti terreno liquido MP tappo rosso che vengono processate dal sistema Bact/Alert 3D.Queste bottiglie contengono un brodo Middlebrook 7H9 modificato supplementato con fattori di crescita a cui bisogna aggiungere la miscela di antibiotici.

Attenzione:non usare miscela di antibiotici fatta in casa in quanto il diluente la miscela di antibiotici contiene anche dei supplementi di crescita .

1) Terreno di coltura Middlebrook 7H9 (0.47%), prodotto di digestione pancreatico della caseina (0.1%), albumina di siero bovino (0.5%), catalasi (48 U/ml) in acqua purificata.Atmosfera di CO₂, azoto, ossigeno sottovuoto.

2) Miscela antibiotica MB/Bact da ricostituire con 10 mL di diluente .
Composizione finale: anfotericina B (0.018%), acido nalidixico (0.04%), polimixina B (10.000 U), azlocillina (0.0034%), trimetoprim (0.0105%), vancomicina (0.0005%).

3) Fluido di ricostituzione MB/Bact- Acido oleico (0.05%), glicerolo (5%), amaranto (0.004%) e albumina di siero bovino (1%) in acqua purificata.I flaconi contengono un volume finale di 15 mL.

Un flaconcino di supplemento antibiotico MB/Bact ricostituito è sufficiente per 20 flaconi MP. Una volta ricostituito, il supplemento antibiotico MB/Bact ha una durata di 7 giorni se conservato in frigorifero.Non gettare il restante fluido di ricostituzione (5 mL) che vanno aggiunti ai fluidi sterili quali Liquor o sangue.

Flaconi MB per emocoltura

Il Flacone MB in combinazione con il liquido di arricchimento Bact/Alert MB è un prodotto studiato per la coltivazione di Mycobacterium spp., dal sangue.Tale terreno non è antibiotato e supporta la crescita di altri microrganismi aerobici , compresi i lieviti, funghi e batteri.Inoculare da 3 a 5 ml di sangue.Non è necessaria la ventilazione.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

- Codice nero. Middlebrook 7H9 (0.47%), prodotto di digestione pancreatica della caseina (0.1%), glicerolo (1%) e SPS (0.025%) in acqua purificata.
- Bact/Alert MB liquido di arricchimento: albumina di siero bovino (14.5%), cloruro di sodio, acido oleico (0.174%), Saponina (4.4%), in acqua purificata.

Terreni solidi Lowenstein-Jensen

Composizione (g/l): diidrogenofosfato di potassio (2.5); solfato di magnesio –7H₂O (0,24); tricitrato di magnesio-14H₂O (0.6); L-asparagina (3.6); verde malachite (0.4); fecola di patata (30).

Additivi: glicerina (12ml); omogenato di uova (1 litro). pH=4,7-4,9 (prima dell'aggiunta dell'omogenizzato).

Il mezzo di coltura è di colore verde chiaro e viene utilizzato sempre in tubi e disposto in forma inclinata all'interno dello stesso, che è chiuso ermeticamente (con tappo proprio). L'incubazione va da 14 giorni a 60 giorni a 37°C. Al quattordicesimo giorno e poi ogni settimana, si ispeziona il mezzo per l'osservazione della crescita di colonie.

<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i> (<i>M. tuberculosis M. bovis</i>)	Colonie rugose, gialle o incolori
Fotocromogeni (Runyoun I) <i>M. kansasii</i> <i>M. simiae</i>	Colonie rugose, di colore arancio quando esposte a una intensa luce per qualche ora
Scotocromogeni (Runyoun II) <i>M. goodii</i> <i>M. xenopi</i>	Colonie lisce di colore arancio anche se non esposte alla luce
Non cromogeni (Runyoun III) <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>	
Organismi a crescita rapida (Runyoun IV) <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	

7- Procedimento dettagliato

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

7.1 PREMESSA

L'esame per la ricerca dei micobatteri comporta le seguenti fasi:

- 1) Decontaminazione ed eventuale fluidificazione del campione in provettoni da centrifuga del tipo Falcon da 50 mL a fondo conico. Questa operazione distrugge eventuali cellule presenti oltre a sciogliere il muco e ha un effetto anche concentrante il campione.
- 2) Centrifugazione per ottenere il sedimento.
- 3) Semina del sedimento su appositi terreni di coltura liquidi o solidi (esame colturale) e striscio del sedimento su vetrino per la colorazione (esame diretto).

NOTA. Tutte le operazioni vanno effettuate rigorosamente sotto cappa a flusso laminare a sicurezza biologica II

7.2 PREPARAZIONE AL TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

- 1) si prendono i fogli di lavoro
- 2) si portano sotto cappa i campioni contenuti nel frigorifero a destra della cappa
- 3) si numerano i campioni, raccogliendo le urine in un unico pool per ogni paziente
- 4) si numerano i provettoni Falcon a tappo a vite azzurro
- 5) si riporta la numerazione progressiva dei campioni su apposito libro a penna, si segna il tipo di materiale. Il pool di urine va sotto un unico numero.
- 6) Si accende la centrifuga Eppendorf, si va su programma 1 che è il programma delle condizioni di centrifugazione dei campioni (3500 rpm x 15 minuti a 4°C). Con il tasto Fast cool si raggiunge la temperatura di 4°C in pochi minuti.
- 7) Si tolgono dal frigorifero le bottiglie MP del sistema Bact/Alert, si aggiunge il supplemento antibiotico ricostituito (500 uL per ogni bottiglia). Le bottiglie MP vanno lasciati qualche tempo a riequilibrarsi a temperatura ambiente prima dell'uso.
- 8) i campioni liquidi quali urine, liquidi cavitari, BAL vanno centrifugati. Il liquor se non occorre l'esame diretto si inietta tal quale nella bottiglia.

Quando si centrifugano le urine su provettoni da 50 mL si preferisce scartare la prima parte delle urine e raccogliere la parte finale.

- 9) Si prepara il tampone fosfato aggiungendo a 500 mL di acqua distillata delle bottiglie, la bustina di tampone fosfato a pH finale 6.8 inclusa nel kit Snap'n Digest. Si agita, si lascia sciogliere il tampone per qualche decina di minuti. Il tampone va ricostituito fresco a ogni seduta.

- 10) Si preparano i vetrini in doppio numerati come sopra

7.3 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI (decontaminazione e fluidificazione)

Espettorati, fluidi purulenti

- 1) si apre il contenitore sterile, si aggiunge un eguale volume di decontaminante (NaOH/acetil cisterna), ci si aiuta con una ansa in modo da staccare dal fondo

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

l'espettorato e si versa nel provettone Falcon. Il volume totale espettorato+ decontaminante-fluidificante non deve superare i 20 mL (10 di campione e 10 di decontaminante)

- 2) si vortexa per circa 20 secondi, non oltre i 30 secondi. Si nota che il campione diventa omogeneo. La soda inoltre distrugge le eventuali cellule presenti oltre a potenziare l'azione fluidificante dell'acetil cisterna, assieme all'effetto stesso del vortexare. Si ottiene così una tripla azione: decontaminazione, fluidificazione, concentrazione del campione.

Urine, liquidi cavitari, BAL :

- 1) si usano i sedimenti di questi materiali. Per i pool di urine: si versa un volume triplo di soda/fluidificante nel provettone contenente il sedimento.
- 2) Si vortexa, si versa sul secondo sedimento
- 3) Come al punto 2, sul terzo sedimento.

Procedura

- Si lascia decontaminare 15-30 minuti sempre sotto cappa a temperatura ambiente
- Si aggiunge il tampone fosfato fino a volume di 50 mL, si agita delicatamente. L'aggiunta del tampone fosfato ha una doppia azione: diluisce la soda, bloccando l'azione decontaminante della stessa e inoltre diminuisce la viscosità del mezzo favorendo la sedimentazione dei micobatteri (abbassa cioè il peso specifico della miscela).
- Si pongono i provettoni negli appositi cestelli da centrifuga con il coperchio di sicurezza.
- Si trasferiscono i cestelli nella centrifuga refrigerata. E' consigliabile non superare i 3500 rpm, anche con centrifuga refrigerata, per pericolo di rottura dei provettoni
- Si centrifuga a 4°C a 3500 rpm x 15 minuti (programma 1 della centrifuga Eppendorf)
- Si decanta il supernatante nell'apposito contenitore con decontaminante (contenente ipoclorito di sodio o fenolo 5%)
- Si ri-sospende il sedimento con 1 ml dello stesso tampone fosfato sterile
- Si iniettano 0.5 ml di sedimento sospeso nelle apposite bottiglie Bact/Alert MP
- Il resto del sedimento serve per approntare i vetrini in doppio.
- Si stacca l'etichetta rimovibile dal flacone e si attacca sui fogli di lavoro precedentemente numerati secondo la numerazione nostra. Questa operazione è molto importante perché identifica il campione.
- Si iniettano 0.5 mL di sedimento tamponato nelle bottiglie Bact/Alert 3D (seguendo le istruzioni del capitolo 7.4)

I vetrini vanno posti in termostato per asciugare e fissare, in mancanza del becco Bunsen. Una alternativa è farli asciugare nell'essiccatore a 42°C per almeno 2 ore. Prima della colorazione è preferibile ri-fissarli in metanolo per 1 minuto.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

7.4 ESAME COLTURALE CON SISTEMA NON RADIOMETRICO (Bact/Alert 3D)

Recentemente sono stati messi a punto vari sistemi di coltura automatizzati che utilizzano terreni liquidi e rilevano lo sviluppo batterico in base alle variazioni di determinati parametri metabolici. Si tratta di sistemi in grado di rilevare variazioni di pressione (il metabolismo dei micobatteri è caratterizzato dalla produzione di gas), produzione di CO₂ o consumo di ossigeno (entrambi caratteristici del metabolismo aerobio dei micobatteri). I terreni liquidi sono addizionati con miscele di antibiotici; 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 e di ottenere una più elevata sensibilità in confronto alle colture su terreni solidi.

Nel nostro laboratorio utilizziamo da un anno il sistema MB/BacT

Principio

Il terreno liquido è contenuto in un flacone sigillato che presenta sul fondo un sensore che vira di colore all'aumentare della concentrazione di CO₂. I flaconi inoculati vengono alloggiati in apposite celle dello strumento incubatore-lettore in cui l'intensità di un raggio luminoso riflesso dal sensore di CO₂ viene misurata da una cellula fotoelettrica. Le variazioni di tale intensità, dovute al viraggio di colore del sensore e, in ultima analisi, alla produzione di CO₂ costituiscono il segnale utilizzato dallo strumento per individuare le colture positive.

Reagenti

Flacone contenente 10 ml di brodo (MB/BacT Process Bottle, Organon Teknika). Il brodo è una variante del Middlebrook 7H9.

Miscela di antibiotici contenente amfotericina B, azlocillina, acido nalidixico, polimixina B e trimetoprim (Kit M.A.S., Organon Teknika).

Supplemento (MB/BacT Enrichment Fluid, Organon Teknika).

Procedura

- Ricostituire la miscela di antibiotici con 10 ml dell'apposito fluido di ricostituzione.
- Aggiungere al flacone di brodo 0,5 ml della miscela di antibiotici.
- Disinfettare i tappi di gomma dei flaconi con disinfettante contenente alcool isopropilico 70%
- Inoculare il flacone con 0,5 ml di campione decontaminato e/o concentrato.
- Disinfettare il tappo di gomma del flacone con una garza imbevuta di disinfettante contenente fenolo.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

•Introdurre il flacone nello strumento seguendo le procedure del Manuale d'uso Bact/Alert presente a fianco dell'apparecchio.

•Sui flaconi segnalati dall'apparecchio come positivi eseguire un preparato atto ad evidenziare la alcol-acido resistenza con una goccia di terreno di coltura per verificare se i microorganismi sviluppatasi siano micobatteri o contaminanti; eventualmente eseguire una subcoltura su terreno solido.Quando la coltura è segnalata come positiva la carica dei micobatteri è tale che un semplice vetrino riesce a evidenziare i batteri alcool-acido resistente senza una previa centrifugazione.

•Una sospensione non omogenea ma che si sedimenta facilmente al fondo della bottiglia fa sospettare una coltura pura di micobatteri, mentre una sospensione densa, fioccosa fa sospettare una contaminazione batterica.

•Si può ricaricare la bottiglia sospetta nello strumento per prolungare la coltura.

•Se la bottiglia è contaminata , decontaminare nuovamente l'intero contenuto del flacone e inocularlo in un nuovo flacone Bact/Alert MP, oppure scartare il flacone e procurarsi un nuovo campione per una nuova coltura.

7.5 IDENTIFICAZIONE DEL CEPPPO

Il ceppo viene identificato come *Mycobacterium tuberculosis complex* usando le sonde molecolari dell'apparecchio LCx Abbott.I sospetti micobatteri non tubercolari vanno inviati a un centro di riferimento (per esempio il C.R.R. micobatteri del Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Careggi di Firenze).

7.6 ESAME MICROSCOPICO

L'esame microscopico è un test rapido che data la scarsa sensibilità permette di evidenziare i micobatteri solo se presenti in carica elevata.

- Preparare due vetrini per campione.I vetrini debbono essere nuovi e ben sgrassati.L'altro vetrino è di riserva in caso di rottura del primo vetrino, difetti di colorazione o controllo dei casi dubbi.
- Trasferire una porzione del campione opportunamente trattato come sopra sul vetrino (una o due gocce di sedimento).Nel caso di campioni urgenti non trattati come sopra, si preleva una ansata di materiale purulento .Nel caso di liquor si deposita una goccia del sedimento al centro del vetrino, si lascia asciugare, si deposita una seconda goccia e così' via.
- Si lascia asciugare all'aria o dentro il termostato una notte

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Fissazione dei vetrini: è molto importante perché per esperienza l'uso di soluzioni acide per la decolorazione tende a dilavare vetrini non ben fissati, soprattutto nel caso di preparati diretti senza decontaminazione e fluidificazione:

- Vetrini in termostato a 37°C per una notte
- Passaggio per 3-4 volte alla fiamma blu o incolore di un becco Bunsen
- Lasciandoli su un essiccatore a 42°C per 2-3 ore e per sicurezza aggiungere prima della colorazione metanolo puro per qualche minuto. Questo metodo è quello da noi usato se la colorazione è urgente e deve essere fatta in giornata.

7.6.1 COLORAZIONE DI ZIEHL NEELSEN

1) carbolfucsina a caldo

- Si diluisce la Fucsina Sigma 1:10 con acqua distillata
- decolorante soluzione 3% di HCl in etanolo. Si ottiene partendo da HCl 37% (12 N) diluendo 45 volumi di HCl con etanolo puro fino a portare a 500). Nel caso di campioni spessi, non trattati si preferisce una soluzione al 20% di acido solforico ottenuto diluendo 1: 4 acido solforico puro (si aggiunge sempre l'acido solforico in acqua e mai viceversa!)
- Colorante di contrasto: sciogliere 0.3 gr di blu di metilene o verde malachite in 100 mL di acqua distillata
- Si copre il vetrino con carbolfucsina diluita come sopra. Si scalda il vetrino, fino alla formazione dei primi vapori, passando sotto il vetrino la fiamma di un batuffolo di cotone impregnato di alcool. Attendere 5 minuti.
- Lavare con acqua di fonte
- Decolorare con la soluzione alcool-acido o acido solforico in acqua, effettuando vari passaggi, finché non vi sia più traccia di colorante nel lavaggio con acqua che segue ad ogni passaggio con decolorante
- Colorare con blu di metilene per circa 1 minuto
- Lavare con acqua di fonte
- Asciugare all'aria e osservare con obiettivo ad immersione x100. I micobatteri appaiono di colore rosso non omogeneo, gli altri batteri e lo sfondo, di colore blu o verde nel caso si usi verde malachite.

2) carbolfucsina a freddo

- Si usa la Fucsina Sigma senza diluizione
- Si diluisce la Fucsina Sigma 1:10 con acqua distillata
- decolorante soluzione 3% di HCl in etanolo. Si ottiene partendo da HCl 37% (12 N) diluendo 42 volumi di HCl 37% con etanolo puro fino a portare a 500 in un cilindro
-). Nel caso di campioni spessi, non trattati si preferisce una soluzione al 20% di acido solforico ottenuto diluendo 1: 4 acido solforico puro (si aggiunge sempre l'acido solforico in acqua e mai viceversa!)

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

- Colorante di contrasto: sciogliere 0.3 gr di blu di metilene o verde malachite in 100 mL di acqua distillata
- Si copre il vetrino con carbolfucsina non diluita .Si attende per 1 ora .
- Lavare con acqua di fonte
- Decolorare con la soluzione alcool-acido o acido solforico in acqua , effettuando vari passaggi , finchè non vi sia piu' traccia di colorante nel lavaggio con acqua che segue ad ogni passaggio con decolorante
- Colorare con blu di metilene per circa 1 minuto
- Lavare con acqua di fonte
- Asciugare all'aria e osservare con obiettivo ad immersione x100 .I micobatteri appaiono di colore rosso non omogeneo , gli altri batteri e lo sfondo, di colore blu o verde nel caso si usi verde malachite.

7.6.2 COLORAZIONE CON FLUOROCROMO-AURAMINA O

1. Auramina O- Dissolvere 0.1 g di Auramina O in 10 mL di etanolo al 95%. Dissolvere 3.0 gr di fenolo in cristalli in 87 mL di acqua distillata. Miscelare le due soluzioni.

2. Soluzione decolorante- Aggiungere cautamente 0.5 mL di acido cloridrico concentrato a 100 mL di etanolo 70%.

3. Permanganato di potassio- Dissolvere 0.5 g di permanganato di potassio (KMnO₄) in 100 mL di acqua distillata.

Procedura

- Coprire i vetrini con la soluzione di auramina O e lasciare agire per 15 minuti a temperatura ambiente.
- Lavare i vetrini in acqua corrente
- Coprire i vetrini con la soluzione decolorante durante 2 minuti
- Lavare i vetrini in acqua corrente
- Coprire i vetrini con la soluzione di permanganato di potassio e lasciare agire per 3 minuti
- Lavare i vetrini in acqua corrente
- Lasciare asciugare a temperatura ambiente
- Osservare i preparati al microscopio fluorescente , con obiettivo x40 , per piu' campi possibili
- I micobatteri appaiono colorati di verde fluorescente , su un fondo castano.

7.6 PROVE DI SENSIBILITA' DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

(kit MycobioGramme Biomerieux)

(tutte le operazioni indicate sono effettuate sotto cappa a flusso laminare a sicurezza biologica II)

Si usa l'apposito kit della Biomerieux che comprende terreni solidi Lowenstein –Jensen. Il principio è il metodo delle proporzioni, introdotto da Canetti. Varie diluizioni bacillari sono seminate sui tubi LJ antibiotati a 1 o più concentrazioni di antibiotico. Il terreno L-J per la pirazinamide è di un colore verde acceso perché a pH acido, in quanto l'attività di questo farmaco si manifesta in vitro a pH acido. I tubi controllo sono i tubi LJ senza antibiotico. Il confronto fra tubi controllo e tubi antibiotati indica la percentuale nei secondi di bacilli resistenti nella popolazione studiata.

Usiamo il metodo indiretto delle proporzioni che parte da un ceppo di micobatteri isolato in terreno liquido del sistema Bact/Alert. Noteremo che le colonie di micobatterio sono immiscibili nel terreno liquido e tendono a depositarsi al fondo. La concentrazione di partenza corrisponde a 5mg di colonie bacillari/mL.

- agitiamo la bottiglia
- preleviamo con una siringa 1mL di questa sospensione, la trasferiamo in una provetta con tappo a vite. Aggiungiamo 3 mL di acqua distillata sterile.
- vortexiamo, per rendere la sospensione omogenea. Se la sospensione non diventa omogenea, si lascia decantare e si preleva il sovrantante. Questa è la sospensione di partenza.
- si diluisce questa sospensione iniziale 1:100 con acqua distillata sterile. Si utilizzerà per la lettura di confronto la sospensione che presenterà un numero contabile (inferiore a 100) di colonie la sospensione iniziale o quella diluita 1:100
- Si riportano i tubi LJ a temperatura ambiente
- Si semina con una siringa da 5 mL 0.2 mL di sospensione diluita 1:100 un tubo di controllo e 0.2 mL di sospensione di partenza i tubi antibiotati e un altro tubo di controllo.
- Si inonda la superficie del terreno e si lascia assorbire la sospensione con i tubi lievemente inclinati, con la vite leggermente allentata, durante tutto il periodo di incubazione
- Controllare dopo 15-20-25 giorni
- Si contano le colonie sui tubi di controllo e sui tubi antibiotati.

Dal confronto fra carica bacillare nei tubi di controllo e carica bacillare nei tubi antibiotati. Le diluizioni nei terreni antibiotati devono permettere una conta di meno di 100. Dal numero di colonie contate sui tubi antibiotati si dedurrà la proporzione dei bacilli resistenti. Sotto una certa proporzione, detta proporzione critica, il ceppo è detto sensibile, sopra è definito resistente

Antibiotico	Concentrazione ug/mL	Proporzione critica %
Isoniazide INH	0.2	1
	1	0.1

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Etambutolo	2 3	1 1
Streptomicina	4 10	1 0.1
PAS	0.5 1	1 0.1
Rifamicina	20 40	2 1
Pirazinamide	200	1

7.7 EMOCOLTURE PER MICOBATTERI

La ricerca dei micobatteri nel sangue è giustificata nei pazienti immunodepressi nei quali tali microrganismi possono dare luogo ad infezioni disseminate. I flaconi MB in uso con il sistema automatico Bact/Alert 3D comprendono Saponina , SPS e altri supplementi che eliminano le procedure di preparazione, prevengono la formazione di coaguli e facilitano la crescita dei micobatteri. Inoculare 3-5 mL di sangue. I flaconi hanno un sensore colorimetrico al fondo su cui incide una luce riflessa per monitorare la presenza e produzione nel tempo di anidride carbonica (CO₂). In caso di positività il sensore passa a un colore più chiaro cioè a un aumento delle unità di riflettanza monitorate dal sistema. La riflettanza del flacone viene monitorata e registrata dallo strumento ogni 10 minuti.

- aggiungere a ogni flacone 1 ml di liquido di arricchimento che contiene l'agente litico
- prima di inoculare il sangue nel flacone MP, disinfettare il tappo di gomma con disinfettante contenente alcool isopropilico 70%:Lasciare asciugare.
- ad inoculo avvenuto disinfettare con disinfettante anti micobatterico contenente fenolo 2%
- Caricare i flaconi per emocoltura nel sistema di rilevazione Bact/Alert 3D. I flaconi possono essere indifferentemente essere caricati nel sistema senza agitazione o in quello per la rilevazione microbica (con agitazione) seguendo le istruzioni contenute nel Manuale d'uso del Bact/Alert 3D.

Una volta caricati i flaconi per emocoltura nello strumento, si raccomanda di lasciarceli per almeno 42 giorni o fino alla positività.

-Quando lo strumento rileva una positività si deve mescolare il contenuto sotto cappa, disinfettare il tappo

-Rimuovere il campione con una siringa per sottoporlo a colorazione con alcool acido resistenza e a sottocoltura su una seconda bottiglia, fare un secondo striscio per sottoporlo a colorazione di Gram

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

-Nel caso lo striscio acido resistente risultasse positivo, eseguire le procedure specifiche di identificazione micobatterica .

-Se entrambe le colorazioni sono negative , è necessario caricare nuovamente il flacone nello strumento fino alla definitiva identificazione. Seguire inoltre la sottocoltura.

7- Calcoli

Non disponibile

8- Controllo di qualità interno

Per controllare che il processo sia stato corretto, si può inoculare una parte del campione decontaminato e concentrato per centrifugazione, in piastre di agar sangue. Solo rarissime colonie dovrebbero crescere sull'agar sangue dopo 48 ore di incubazione a 37°C.

E' necessario registrare la percentuale dei campioni contaminati. In genere la contaminazione avviene entro 5 giorni successivi all'inizio della incubazione ed è rilevata dalla torbidità omogenea della bottiglia e dalla curva di crescita che mostra un netto incremento. Sono considerate accettabili percentuali di contaminazione del 3-5% . Se la percentuale di contaminazione è inferiore al 3% , il processo di decontaminazione è troppo energico , se invece supera il 5% il decontaminante è troppo debole o la fluidificazione è stata incompleta.

Per l'esame diretto approntiamo sempre dei vetrini positivi ottenuti da colture pure di micobatteri stemperati in espettorati sicuramente negativi e processati come sopra. Si possono usare questi campioni simulati anche per il controllo di qualità interno dell'esame colturale.

9- Valori di riferimento, interpretazione, valori critici

Nel caso dell'esame microscopico diretto se negativo repertare come “ Non si osservano bastoncelli alcool acido resistenti “. Se si osservano si referta seguendo lo schema della tabella , considerando che si usa solo la colorazione di Ziehl Neelsen e non la colorazione fluorescente.

Carbol fuscina x100	Auramina x40	Referto
1-2 BAAR/vetrino	1-2/70 campi	Rarissimi bastoncelli alcool acido resistenti (ripetere)
1-9/100 campi	2-18/50 campi	+ rari
1-9/10 campi	4-36/10 campi	++ alcuni
1-9/campo	4-36/campo	+++ discreti
>9 campo	>36/campo	+++ numerosi

Nel caso dell'esame colturale negativo refertare: “Non sviluppo di Mycobacterium spp.”
Se positivo per MTB repertare “Sviluppo di Mycobacterium tuberculosis complex”.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

10- Linearità e limite di rilevamento

L'esame diretto per ricerca di micobatteri ha sempre una bassa sensibilità (intorno al 50%) , specie con la colorazione di Ziehl-Neelsen .Pertanto è consigliabile per il clinico sempre associare all'esame diretto quello colturale che non solo ha una sensibilità superiore rispetto all'esame diretto (bottiglie positive/strisci negativi) ma con il sistema automatico Bact/Alert 3D si hanno tempi di positivizzazione in media di una settimana inferiore a quelli della coltura tradizionale .I micobatteri nei materiali biologici sono in genere poco numerosi .E' pertanto consigliabile , in linea di massima, prelevare i campioni per tre giorni consecutivi.

Tempo (in giorni) di rilevamento dei micobatteri con i diversi sistemi di coltura

Organismi	MGIT 960	MB/Bact	BACTEC 460	LJ
M. tuberculosis complex	12.6 (4-37)	15.9 (6-40)	11.8 (3-30)	22.1 (13-45)
Micobatteri non tubercolari	16.6 (5-40)	16.1 (6-44)	16.1 (3-40)	22.4 (15-44)

I flaconi per micobatteri MP e MB sono incubati a 37°C, il che preclude potenzialmente il recupero dei micobatteri che richiedono temperature di incubazione diverse (ad esempio *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum*). In rare occasioni , si possono trovare organismi che pur crescendo nel terreno di coltura liquido, non producono sufficiente anidride carbonica per essere considerati positivi. Per esempio, i campioni prelevati da pazienti sottoposti a trattamento con farmaci antitubercolari possono presentare una crescita alterata.

11- Limitazioni del metodo

Paziente sotto terapia con farmaci antitubercolari , raccolta impropria del campione, non ben conservati , temperatura di incubazione differente da 35-37°C (che recupera solo i micobatteri cutanei).

12- Riferimenti bibliografici

Mandler F., Passerini Tosi C., Scarpaio 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 Volume 14, numero 4, 313-330, 1999.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Benjamin WH Jr., Waites KB, Beverly A. et al. Comparison of MB/BactT system with a revised antibiotic supplement kit to the Bactec 460 system for detection of mycobacteria in clinical specimens. J. Clin Microbiol 1998;36:3234-3238.

Cernoch PL., Enns RK, Saubolle MA., Wallace RJ Jr. Cumitech 16 A, Laboratory diagnosis of the Mycobacterioses. AS Weissfeld ED. American Society for Microbiology, Washington DC 1994.

Decreto Legislativo 19 settembre 1994 N. 626

NCCLS Antymycobacterial susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis ;tentative standard. M24-T. NCCLS Wayne Pa 1995.

Ratnam S., March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. J. Clin Microbiol 1986;23:582-5.

Bruno G. et al: Diagnosi microbiologica e sensibilità in vitro di Mycobacterium tuberculosis complex nella ASL N. 4 di L'Aquila nel periodo gennaio 1992-dicembre 1994. Lotta contro la Tuberculosis e le malattie polmonari sociali. Anno LXVIII, N. 2-3 1997.

Mycobacteria Charter 17 :893-952 in Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C. Jr: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Fifth editino. Lippicott W & W. 1997.

Alcaide F., Benitez M.A., Escriba J.M., Martin R.: Evaluation of the Bactec MGIT 960 and the MB/Bact Systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. Journal of Clinical Microbiology , Jan. 2000 , p.398-401.

Barba A. , Tessari G., Schena D. : Skin infection due to Mycobacterium marinum in a renal transplant recipient. Journal of Nephrology Vol. 9 No. 2 1996 p. 78-80.

Tortoli E., Kroppenstedt, Bartoloni A., Caroli G., Jan I., Pawloski J., Emler S.: Mycobacterium tusciae sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49, 1839-1844.

Mac Carter Y.S., Robinson A.: Quality of sputum specimens for Mycobacteria culture. Clinical Microbiology and infectious disease. 769-773, 1995.

Brunello F., Fontana R.: Reliability of the MB/BactSystem for Testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis Complex isoaltes to antituberculous drugs. Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2000, p. 872-873.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Metchock B.G., Nolte F.S., Wallace R. Jr :Mycobacterium p. 399-437.in Murray P., Baron E.J., Tenoer F.C., Tenover F.C., Yolken R.H. Manual of Clinical Microbiology 7th edition. ASM 1999.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.