

Percorso Diagnostico MICOBATTERIOSI

Revisione marzo 2023

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)
Coordinatore: Cristina Giraldi – c.giraldi54@gmail.com

Proprietà intellettuale di AMCLI ETS.

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico " titolo PD" – Rif. 2023-17, rev. 2023"

Rif.2023-17

REFERENTE

Daniela Maria Cirillo, TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano

GRUPPO DI LAVORO AMCLI MICOBATTERI (GLAMIC)

ESTENSORI DEL DOCUMENTO

Daniela Maria Cirillo, TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano- GLAMIC AMCLI

Anna Camaggi, Microbiologia e Virologia, AOU Maggiore della Carità, Novara-GLAMIC

Antonio Curtoni, Microbiologia e Virologia, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino-GLAMIC AMCLI

Arash Ghodousi, TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano-GLAMIC AMCLI

Giulia Fregni Serpini, SSD Virologia e Microbiologia Molecolare Policlinico di Modena-GLAMIC AMCLI

Stefania Torri, Microbiologia ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano-GLAMIC AMCLI

Ente del Terzo Settore

REVISORI INTERNI

Maurizio Ferrarese, SSD Tisiologia Clinica e Preventiva ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda-Villa Marelli

REVISORI ESTERNI

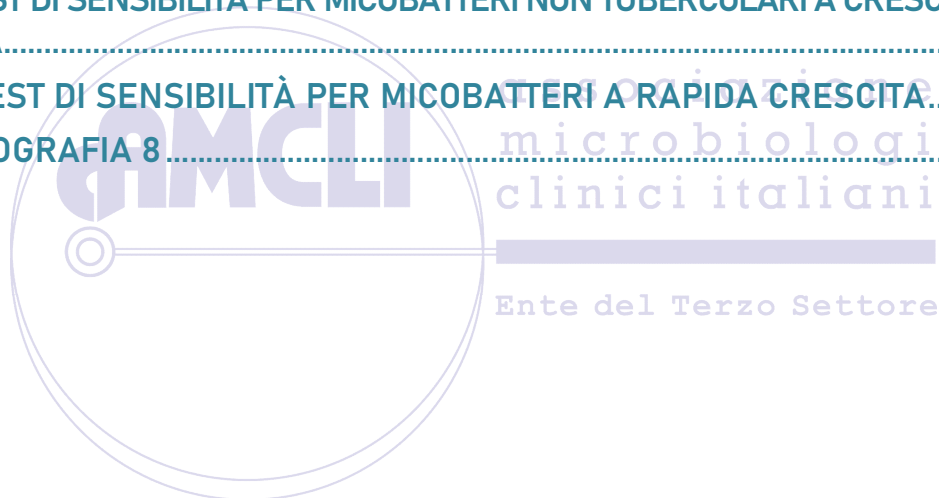
Enrico Tortoli, già TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano

Luigi Ruffo Codecasa, SSD Tisiologia Clinica e Preventiva, Centro Regionale di Riferimento per il Controllo della TB, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Villa Marelli, Milano

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	6
BIBLIOGRAFIA 1.....	8
2. FASE PREANALITICA.....	9
2.1. RACCOLTA DEI CAMPIONI	9
2.2. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE E TRASPORTO	12
BIBLIOGRAFIA 2	14
3. Annesso 1 - ESAME MICROSCOPICO	16
3.1. ESECUZIONE DELLO STRISCIO	16
3.2. COLORAZIONE.....	17
3.2.1. COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELSEN (CARBOLFUCSINA A CALDO)	17
3.2.2. COLORAZIONE DI KINYOUN (CARBOLFUCSINA A FREDDO)	18
3.2.3. COLORAZIONE FLUOROCROMICA CON AURAMINA E SUE VARIANTI.....	18
3.3 OSSERVAZIONE MICROSCOPICA.....	19
3.4 MICROSCOPIA A LED	19
3.5 REFERTAZIONE.....	19
BIBLIOGRAFIA 3	20
4.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	21
4.2. DECONTAMINAZIONE.....	22
4.3. ESAME CULTURALE	23
4.3.1. CULTURA IN TERRENO SOLIDO	23
4.3.2. CULTURA IN TERRENO LIQUIDO	23
4.4. EMOCOLTURA	24
4.5. CONTROLLO DI QUALITÀ	24
4.6. CROSS-CONTAMINAZIONI.....	25
4.7. REFERTAZIONE.....	25
BIBLIOGRAFIA 4.....	26
5. Annesso 3 - IDENTIFICAZIONE MEDIANTE TEST DI AMPLIFICAZIONE.....	28
5.1. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE LPA	28
5.2. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENICO	28
5.3. PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ	29
BIBLIOGRAFIA 5	30

6. Annesso 4 - IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF (MALDI-TOF MS).....	31
BIBLIOGRAFIA 6	32
7. Annesso 5 - IL WGS NELLA GESTIONE DELLE INFEZIONI DA NTM	34
7.1. WGS NELLA DIAGNOSTICA DI NTM	34
7.2. WGS E PREVISIONE DELLA SENSIBILITÀ ANTIMICROBICA	36
7.3. LE PROSPETTIVE DEL WGS NEL TRACCIARE LE INFEZIONI NOSOCOMIALI DA NTM	37
7.4. LE TECNOLOGIE DI SEQUENZIAMENTO NELLA GESTIONE DELLE INFEZIONI DA NTM	38
BIBLIOGRAFIA 7	39
8. Annesso 6 - TEST DI SENSIBILITÀ.....	41
8.1. TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI NON TUBERCOLARI A CRESCITA LENTA.....	41
8.2. TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA.....	42
BIBLIOGRAFIA 8.....	44



Ente del Terzo Settore

ABBREVIAZIONI

ATS	American Thoracic Society
ATCC	American Type Culture Collection
BAAR	Bacilli alcol-acido-resistenti
CLSI	The Clinical & Laboratory Standards Institute
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ERS	European Respiratory Society
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
IDSA	Infectious Diseases Society of America
LED	Light-emitting diode
LPA	Line Probe Assay
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry
MIC	Concentrazione minima inibente
MPT64	Antigene specifico per MTBC
NTM	Non tuberculous mycobacteria (= Micobatteri non tubercolari)
NGS	Next Generation Sequencing
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
SNP	Singoli polimorfismi nucleotidici
TB	Tubercolosi
WGS	Whole genome sequencing

1. INTRODUZIONE

Il termine micobatteriosi comprende le patologie causate da micobatteri che non fanno parte del *Mycobacterium tuberculosis* complex e che non appartengono alle specie *Mycobacterium leprae*.

Fra i micobatteri non tubercolari (MNT o più comunemente NTM, in inglese) ad oggi si distinguono oltre 190 specie [1,2] normalmente presenti nell'ambiente (suolo ed acque); alcune di queste specie possono essere responsabili di patologie umane in presenza di fattori predisponenti. Le più frequenti sono le patologie respiratorie, meno frequenti quelle linfonodali, cutanee, osteo-articolari e disseminate. Il laboratorio di micobatteriologia ha un ruolo critico nella diagnosi di NTM.

La diagnostica delle micobatteriosi polmonari presenta delle peculiarità dovute alla natura ubiquitaria degli NTM. I criteri ATS/ERS/ESCMID/IDSA [1, 2] raccomandano l'utilizzo combinato di criteri clinici, radiologici e microbiologici per la diagnosi di malattia polmonare da NTM (Tab. 1).

Tabella 1 - Criteri Clinici e Microbiologici per la diagnosi di malattia polmonare da NTM^a

Clinico	Sintomi polmonari o sistemici	Entrambi richiesti
Radiologico	Opacità nodulari o cavitarie sulla radiografia del torace o una TAC che mostri bronchiectasie con piccoli noduli multipli	
e	Esclusione di altre diagnosi	
Microbiologico ^b	1. Coltura positiva da almeno due campioni separati di espettorato. Se i risultati non sono diagnostici, prendere in considerazione la ripetizione di microscopia e coltura su nuovi campioni di espettorato oppure 2. La coltura positiva per NTM da broncolavaggio oppure 3. Biopsia transbronchiale o altra biopsia polmonare positiva per NTM o biopsia con caratteristiche istologiche compatibili con infezione da micobatteri (infiammazione granulomatosa o microscopia positiva per BAAR) e uno o più espettorati o broncolavaggio con coltura positiva per NTM	

(^a) Il consulto tra esperti è necessario soprattutto quando vengono rilevati NTM che si isolano raramente o che di solito rappresentano una contaminazione ambientale. I pazienti sospettati di avere una malattia polmonare da NTM ma che non soddisfano i criteri diagnostici devono essere seguiti fino a quando la diagnosi non venga stabilita con certezza o esclusa. La diagnosi di malattia polmonare da NTM non richiede di per sé l'istituzione di una terapia, che è una decisione basata sui potenziali rischi e benefici della terapia per i singoli pazienti.

(^b) Quando si ottengono due colture positive, gli isolati devono essere della stessa specie di NTM (o sottospecie nel caso di *M. abscessus*) per soddisfare i criteri di malattia.

La significatività di un NTM isolato da escreato di un soggetto che presenta i criteri clinici deve essere interpretata in base al numero di colture risultate positive per la stessa specie. Infatti gli NTM isolati da materiali respiratori sono spesso contaminanti ambientali

e un singolo campione di espettorato non è sufficiente per distinguere tra contaminazione e malattia. Inoltre, la stessa specie di NTM deve essere isolata in due o più colture indipendenti di espettorato, raccolti a distanza di circa una settimana, perché possa essere considerata significativa. In presenza di un solo isolamento, se il sospetto clinico è elevato, può essere giustificata la raccolta di un campione mediante metodiche invasive o di ulteriori espettorati. La positività per NTM da un singolo campione di escreato può essere considerata diagnostica solo se questo è stato isolato da un paziente in cui la biopsia polmonare evidenzia lesioni granulomatose. Un solo isolamento, con quadro clinico compatibile, può essere invece considerato diagnostico se ottenuto da bronco-lavaggio.

Per il follow-up sono previsti esami colturali dell'espettorato a 3 e 6 mesi e successivamente a intervalli di 6 mesi a meno che l'aggravamento del quadro clinico suggerisca scadenze più ravvicinate.

Per le patologie micobatteriche extra-respiratorie l'isolamento singolo di NTM da linfonodo, biopsia o sangue è invece sempre diagnostico.

L'esame microscopico per la ricerca di NTM ha sensibilità molto bassa. Tuttavia, quando risulta positivo indica una carica microbica elevata e la contaminazione del campione risulta pertanto poco probabile. In tali casi è consigliata l'esecuzione della PCR per *M. tuberculosis* complex che, se negativa, conferma indirettamente la micobatteriosi. La procedura di colorazione non differisce da quella utilizzata nella diagnostica del bacillo tubercolare ([vedi Annesso 1](#)).

L'esame colturale non differisce da quello per la ricerca del bacillo tubercolare ([vedi Annesso 2](#)). Deve quindi essere eseguito in parallelo sia su terreno solido che liquido. Possono tuttavia rendersi necessari tempi e temperature di incubazione differenti, a seconda del sospetto diagnostico. Ad esempio, *M. xenopi* presenta crescita rallentata in terreno liquido alla temperatura di incubazione standard di 36°C, è quindi consigliabile, in caso di sospetto e coltura negativa alla scadenza prevista di 42 giorni, il prolungamento dell'incubazione per ulteriori due settimane. In caso di sospetto da *M. marinum* su campioni di natura cutanea è raccomandata l'incubazione del terreno solido a 32°C.

L'identificazione è uno dei punti critici per una corretta diagnosi di malattia da NTM. Le varie specie hanno infatti differente patogenicità e differente sensibilità ai farmaci. Attualmente esistono quattro metodiche che permettono di ottenere identificazioni qualitativamente accettabili: LPA, realtime PCR specifiche per alcune specie di NTM, il sequenziamento genico mediante tecnica Sanger ([vedi Annesso 3](#)) e la spettrometria di massa (MALDI-TOF MS). I limiti dei kit molecolari sono rappresentati dal modesto numero di specie che possono essere identificate e dalla cross-reattività di alcune sonde. Nell'identificazione mediante sequenziamento di geni target l'esperienza del microbiologo gioca un ruolo fondamentale tanto nella scelta della regione genica da sequenziare che nell'interpretazione del risultato. Il sistema MALDI-TOF MS ha semplificato l'identificazione dei micobatteri; al momento il principale elemento limitante sembra essere il database di spettri micobatterici disponibile nel sistema ([vedi Annesso 4](#)). La possibilità negli ultimi anni di poter sequenziare l'intero genoma (WGS) consente di superare i limiti dei test convenzionali, utilizzati per la diagnosi delle infezioni da micobatteri, e al contempo di comprendere meglio la diversità globale delle specie NTM. WGS può identificare tutti i singoli polimorfismi nucleotidici (SNP) associati a resistenza, così come SNP filogenetici caratteristici per le singole specie NTM [3].

La tecnologia WGS per l'identificazione di micobatteri è attualmente disponibile solo in pochi laboratori di riferimento cui devono essere inviati i ceppi quando il clinico lo ritenga necessario (*vedi Annesso 5*).

Per l'antibiogramma dei NTM, le linee guida CLSI [4,5] raccomandano l'impiego della microdiluizione in brodo con determinazione delle MIC. In linea generale un vero e proprio antibiogramma può essere eseguito sulle specie a crescita rapida mentre, per quelle a crescita lenta, è previsto il saggio della sensibilità solo per alcune specie e limitatamente a pochi farmaci (*vedi Annesso 6*).

BIBLIOGRAFIA 1

1. Charles L Daley, Jonathan M Iaccarino , Christoph Lange, Emmanuelle Cambau, Richard J Wallace Jr, Claire Andrejak, Erik C Böttger, Jan Brozek, David E Griffith, Lorenzo Guglielmetti, Gwen A Huitt, Shandra L Knight, Philip Leitman, Theodore K Marras, Kenneth N Olivier, Miguel Santin, Jason E Stout, Enrico Tortoli, Jakko van Ingen, Dirk Wagner, Kevin L Winthrop. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Eur Respir J*. 2020 Jul 7;56(1):2000535.
2. Daley C.L, Iaccarino J.M., Lange L., Cambau E., Wallace R.J.Jr, Andrejak C., Böttger E.C., Brozek J., Griffith D.E., Guglielmetti L., Huitt G.A., Knight S.L., Leitman P., Marras T.K., Olivier K.N., Miguel Santin S., Stout J.E., Tortoli E., van Ingen J., Wagner D., Winthrop K.L. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ESCMID/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Clinical Infectious Diseases®* 2020;71(4): e1-e36
3. Dohál, M.; Porvazník, I.; Solovič, I.; Mokry, J. Whole Genome Sequencing in the Management of Non-Tuberculous Mycobacterial Infections. *Microorganisms* 2021, 9, 2237. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112237>
4. CLSI, *Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia spp, and Other Aerobic Actinomycetes*, 3rd Ed., CLSI Standard M24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
5. CLSI, *Performance Standards for Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp and Other Aerobic Actinomycetes*, approved standard 1st Ed., CLSI Supplement M62. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

2. FASE PREANALITICA

La resa diagnostica dei test microbiologici dipende in larga misura dalla probabilità pre-test, ovvero dalla probabilità che il paziente in esame abbia realmente un'infezione dovuta al microrganismo oggetto della ricerca [1].

Perché la probabilità pre-test di una malattia da micobatteri sia sufficientemente elevata è necessario che:

in caso di localizzazione polmonare, siano presenti:

- sintomi tipici (tosse, febbre e sudorazioni notturne di durata superiore alle 3 settimane, accompagnate o meno da emottisi) oppure sintomi compatibili (espettorazione, calo ponderale);
- associazione con quadri radiologici del torace caratteristici (lesioni cavitarie o nodulari, infiltrati alveolari o interstiziali localizzati prevalentemente ai lobi superiori o al segmento apicale del lobo inferiore), oppure con quadri radiologici compatibili (adenopatia ilare, addensamenti simil-pneumonitici, atelettasia, versamento pleurico, bronchiectasie) [2] oppure con il rilevamento, all'esame TAC del torace, di noduli centrolobulari con aspetto di "albero in fiore";

in caso di localizzazione extrapolmonare, siano presenti:

- segni e sintomi localizzati associati a diagnostica per immagini compatibile con infezione da micobatteri [3].

Importanti eccezioni riguardano:

- i pazienti gravemente immunodepressi (in particolare HIV-positivi), che possono presentare gravi forme polmonari anche in assenza di lesioni radiologiche [4,5];

i pazienti pediatrici (<10 anni di età), nei quali si può avere scarsa sintomatologia clinica associata a opacità polmonari e adenopatia ilare [6,7].

Il materiale da inviare in laboratorio deve essere prelevato dal distretto corporeo sede della sospetta infezione, anche nel caso in cui sia necessario adottare procedure invasive (Tab. 1).

L'attendibilità dei risultati dipende dalle modalità con cui i campioni sono stati prelevati, trasportati e conservati.

2.1. RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il prelievo del materiale deve essere effettuato:

- prima dell'inizio della terapia antibiotica; è tuttavia possibile inviare campioni successivi per il follow-up del paziente in terapia;
- in modo sterile, per evitare contaminazioni;
- in quantità adeguata, per evitare falsi negativi;
- in un numero adeguato di campioni, per evitare falsi negativi;
- evitando, ove possibile, l'uso di tamponi;
- utilizzando contenitori monouso sterili, con tappo a vite;
- senza l'aggiunta di conservanti o fissativi;
- facendo attenzione a non contaminare la superficie esterna del contenitore con il materiale biologico.

Il contenitore deve essere contrassegnato con un'etichetta indicante i dati anagrafici del paziente, il tipo di materiale, la sede di prelievo, la data e l'ora di raccolta.

Le indicazioni sulla modalità di raccolta dei micobatteri sono riportate nella Tabella 1.

La localizzazione di gran lunga più frequente delle infezioni micobatteriche è quella polmonare, pertanto la maggioranza dei campioni è rappresentata da materiale di origine respiratoria.

Espettorato

Due campioni di ≥ 3 ml devono essere raccolti nella stessa giornata o in giorni diversi di cui almeno uno di primo mattino. I campioni prelevati la mattina presto (cioè poco dopo il risveglio del paziente) hanno la massima resa [8]. Al fine di ottenere un campione adeguato per qualità e quantità è preferibile che il paziente sia assistito da personale qualificato durante la raccolta [8,9]. L'espettorato deve provenire dalle basse vie aeree, espulso con un colpo di tosse. Il campione non deve essere costituito da saliva o contaminato da secrezioni naso-faringee. La raccolta nello stesso contenitore di escreti prelevati in momenti diversi non è accettabile.

Espettorato indotto

Se il paziente ha difficoltà nell'espettorare spontaneamente si può ricorrere all'induzione facendogli inspirare, lentamente e profondamente per un periodo di 15-20 minuti, un aerosol di soluzione salina ipertonica generato sterilmente da un nebulizzatore ultrasonico [10]. Per evitare rischi di trasmissione nosocomiale, l'induzione aerosolica deve essere eseguita in condizioni di isolamento respiratorio. La procedura per la raccolta dell'espettorato indotto è ben tollerata da tutti i pazienti, bambini inclusi. Poiché l'aspetto dell'espettorato indotto è quasi sempre salivare, si raccomanda di segnalare al laboratorio la natura del materiale, per evitare che possa essere considerato non idoneo. Nonostante questa modalità di raccolta sia poco utilizzata nella pratica clinica in Italia, numerosi studi hanno dimostrato che ha una resa diagnostica superiore all'aspirato gastrico [11] e pari, o addirittura superiore, a quella dei materiali raccolti mediante broncoscopia [9, 12]. L'escreato indotto risulta vantaggioso rispetto alla broncoscopia anche dal punto di vista del rapporto costo/beneficio [2].

Broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare

I campioni prelevati tramite broncoscopia sono diventati oggi i materiali respiratori più frequentemente utilizzati dopo gli espettorati. Tale ricerca è giustificata solo nel caso in cui la ricerca su escreato abbia dato esito negativo, in particolare in pazienti con lesioni cavitari o infiltrati polmonari, e nei soggetti immunodepressi sia in presenza che in assenza di anomalie radiologiche del polmone. La resa diagnostica del broncolavaggio è superiore a quella dell'aspirato gastrico [13], ma uguale, o lievemente inferiore, a quella dell'escreato e dell'escreato indotto [12,14]. Una buona resa diagnostica caratterizza i campioni di escreato raccolti subito dopo l'esecuzione della broncoscopia. Il volume del prelievo di broncoaspirato e lavaggio bronco-alveolare non deve essere inferiore a 3 mL [6]. I broncoscopi devono essere disinfettati accuratamente per evitare cross-contaminazioni [15,16]

Aspirato gastrico

L'aspirato gastrico, riservato ai casi in cui il paziente non sia in grado di espettorare spontaneamente o dopo induzione aerosolica, è il più comunemente impiegato nei bambini. Va eseguito al mattino, quando il paziente è a digiuno da almeno otto ore, utilizzando 25-50 mL di acqua distillata sterile. La procedura, eseguita in 3 giorni

consecutivi, richiede l'ospedalizzazione del paziente e la disponibilità di ambienti idonei all'isolamento respiratorio ed è controindicata in bambini affetti da diatesi emorragiche o con basso numero di piastrine. Il pH del campione deve essere neutralizzato entro un'ora dal prelievo, aggiungendo all'aspirato carbonato di sodio [8].

Liquidi cavitari

I materiali contenuti in raccolte chiuse, quali liquido pleurico, pericardico, sinoviale, ascitico e peritoneale, devono essere prelevati usando tecniche di aspirazione o procedure chirurgiche più complesse. Devono essere usate provette con anticoagulante, poiché il liquido prodotto nel corso di una reazione infiammatoria (essudato) può contenere fibrinogeno. Dato che l'EDTA è tossico per i micobatteri e l'eparina può inibire la Taq polimerasi, l'anticoagulante di riferimento è il citrato trisodico. Il volume consigliato è di almeno 15 mL [17]. L'espettorato indotto si è dimostrato più efficace del liquido pleurico e inferiore alla sola biopsia pleurica, per la diagnosi microbiologica di pleurite tubercolare [18]. Nei pazienti immunocompetenti con pleurite tubercolare diagnosticata istologicamente, la coltura del liquido pleurico è positiva in meno del 40% dei casi, mentre tale percentuale risulta molto più elevata nel caso in cui il campione venga prelevato da un empiema pleurico. Infatti la pleurite è prevalentemente reattiva nel primo caso, mentre è sicuramente legata alla presenza dell'agente eziologico nel secondo. Stando così le cose, la coltura del liquido pleurico dovrebbe essere richiesta basandosi sulla presenza di fattori predittivi di malattia tubercolare, quali un forte sospetto clinico, una pleurite meta-pneumonica o un empiema pleurico [18].

Liquido cefalo-rachidiano (liquor)

Occorre prelevarne il massimo volume possibile. Per un esame adeguato sono necessari non meno di 2-3 mL [6]. Nel caso in cui non si possa disporre della quantità indicata, i test debbono essere eseguiti a partire da quello di maggiore sensibilità indipendentemente dalla richiesta del clinico. Si eseguirà per prima l'amplificazione genica utilizzando test molecolari ad alta sensibilità, poi la coltura. La microscopia ha una sensibilità molto bassa anche dopo concentrazione del liquor [19].

Materiali necrotico-purulenti

Fatta eccezione per i casi di drenaggio spontaneo (tragitti fistolosi da linfonodi colliquati o apertura all'esterno di raccolte ascessuali), i materiali necrotico-purulenti vengono raccolti tramite agoaspirato transcutaneo. La tecnica dell'agoaspirato può essere applicata anche a linfonodi o a masse localizzate in sede mediastinica, endoaddominale e/o retroperitoneale, eseguendo il prelievo in corso di broncoscopia o di endoscopia dell'apparato digerente [20]. L'uso del tampone deve essere limitato ai casi in cui il prelievo con siringa non sia possibile; in tali casi si stempera il materiale prelevato dalla lesione in 2-3 mL di soluzione fisiologica sterile, ripetendo l'operazione più volte fino ad ottenere un campione piuttosto denso. I materiali raccolti mediante tamponi posti in terreno di trasporto agarizzato non sono idonei [17].

Urine

Dopo pulizia accurata dei genitali esterni, si raccolgono almeno 50 mL di urina includendo anche il primo mitto [17]; la modalità di raccolta mediante mitto intermedio è sconsigliata. È raccomandato l'invio di 3 campioni della prima urina del mattino raccolti in giorni consecutivi [8]. In alternativa il prelievo può essere effettuato mediante cateterizzazione o con puntura sovrapubica. La raccolta delle 24 ore o le urine da sacca non sono utilizzabili a causa della frequenza con cui si verificano contaminazioni. Pazienti

sottoposti ad antibioticoterapia ad ampio spettro possono eliminare con le urine sostanze capaci di inibire o ritardare la crescita dei micobatteri (in particolare i chinoloni).

Feci

Occorre raccogliere una piccola quantità di feci (pari al volume di una noce) in un contenitore sterile, prestando attenzione a non contaminarlo esternamente. Non è possibile utilizzare tamponi rettali. La ricerca dei micobatteri su campioni di feci non è raccomandata, può essere tuttavia utilizzata per la diagnosi di tubercolosi polmonare in pazienti anziani e dal 2021, (OMS) ha raccomandato le feci come nuovo tipo di campione insieme all'espettorato (espettorato o indotto), aspirato nasofaringeo o aspirato gastrico (AG) nei bambini di età inferiore a 10 anni con segni e sintomi di tubercolosi polmonare che, non riuscendo ad espettorare, deglutiscono l'escreato [6, 7]; essa dovrebbe essere preventivamente concordata con il clinico.

Biopsie o prelievi operatori

I tessuti devono essere posti in contenitori sterili senza conservanti o fissativi; in nessun caso i frammenti devono essere avvolti in garza. Occorre aggiungere soluzione salina sterile in quantità sufficiente da evitare l'essiccamento dei campioni di piccole dimensioni. Poiché si tratta di campioni ottenuti tramite procedure invasive e che rivestono un ruolo diagnostico insostituibile, è necessario attivarsi per evitare che al momento del prelievo anche la parte da inviare alla microbiologia sia posta erroneamente in fissativo, come quella destinata all'anatomia patologica. Nel sospetto di micobatteriosi disseminata e in assenza di segni di localizzazione si può eseguire una biopsia epatica. Nel caso di sospetta tubercolosi genitale femminile il materiale di elezione è l'endometrio ottenuto mediante raschiamento.

Materiale da lesioni cutanee

La raccolta mediante tampone deve essere limitata ai casi in cui non sia possibile eseguire biopsia o agoaspirato. Nelle ulcere si deve raccogliere il campione alla periferia della lesione. I materiali raccolti mediante tamponi con terreno di trasporto agarizzato non sono idonei.

Sangue e midollo emopoietico

Sangue e midollo osseo costituiscono i materiali d'elezione per la diagnosi delle forme disseminate [22]. Per il prelievo di sangue periferico occorre disinfettare la cute con le stesse modalità delle emocolture tradizionali. È possibile effettuare il prelievo direttamente nel flacone di coltura nel caso in cui si impieghino sistemi che prevedono flaconi dedicati. Si consiglia, dove possibile prelevare almeno 2 emocolture, nello stesso momento oppure entro le 24 ore. Due emocolture aumentano la resa diagnostica, in particolare in pazienti con infezione da HIV quando l'espettorato non è ottenibile [22, 23].

2.2. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE E TRASPORTO

Il trasporto al laboratorio deve essere il più rapido possibile [8].

I campioni dovrebbero essere processati entro poche ore dal momento del loro arrivo in laboratorio; la conservazione è tuttavia possibile a +4°C per un massimo di 2-3 giorni, periodo per il quale è preservata la vitalità dei micobatteri. Fanno eccezione le emocolture che vanno conservate a temperatura ambiente.

Per la spedizione si devono seguire le modalità previste dalla Circolare del Ministero della Salute n° 3 dell'8 maggio 2003. Utili indicazioni sono anche contenute in: Spedizione

sicura di campioni e materiali infetti. In: Manuale di biosicurezza in laboratorio. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. Supplemento al n° 2, vol. 31, pag. 44-49, 1995.

Idoneità dei campioni

Campioni non idonei o pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere accettati, segnalando al clinico i motivi del rifiuto. Tali campioni dovrebbero essere tuttavia conservati per almeno 2 giorni per fornire al clinico l'opportunità di richiederne, in via eccezionale, il trattamento nel caso di impossibilità di raccogliere un campione adeguato.

Tabella 1 – Specifiche per la raccolta di campioni biologici per la ricerca di micobatteri

TIPO DI CAMPIONE	REQUISITI	ISTRUZIONI SPECIFICHE	NON IDONEI
Aspirato gastrico	≥5-10 mL raccolto al mattino dopo almeno 8 ore di digiuno, per 3 giorni consecutivi	Neutralizzazione con carbonato di sodio	Campioni non neutralizzati
Broncoaspirato, BAL, aspirato trans-tracheale	≥3 mL	Disinfezione accurata del broncoscopio	
Espettorato	3-5 mL almeno 2 campioni di cui almeno uno del mattino presto e il secondo raccolto anche a poche ore di distanza	Istruire il paziente su come espettorare	Saliva, pool di campioni
Espettorato indotto	5-10 mL raccolto al mattino, per 3 giorni consecutivi	Specificare che si tratta di espettorato indotto	
Feci	3-5 g in contenitore senza conservanti	Non idoneo per colturale di TB, utilizzabile per determinazione molecolare se processato in modo adeguato	
Linfonodo	Linfonodo, o porzione di esso, in contenitore senza fissativo o conservante	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in fissativi, campioni inclusi in paraffina
Liquidi cavitari: pleurico, pericardico, peritoneale	≥15 mL in provetta sterile con citrato trisodico	Per la diagnosi di pleurite tubercolare sono più indicati biopsia pleurica e espettorato indotto	
Liquor	≥2 mL		
Materiale da lesione cutanea	La quantità massima possibile	Se non è possibile eseguire il prelievo con siringa o biopsia utilizzare tamponi senza terreno di trasporto (o terreno di trasporto liquido)	Tampone con terreno di trasporto agarizzato
Materiale necrotico-ascessuale	La quantità massima possibile	Se non è possibile eseguire il prelievo con siringa o biopsia utilizzare tamponi senza terreno di trasporto (o terreno di trasporto liquido)	Tampone con terreno di trasporto agarizzato

Midollo emopoietico	La quantità massima possibile direttamente nel flacone da emocoltura specifico per micobatteri, o in provetta con citrato trisodico		Campione coagulato o raccolto con EDTA
Tessuto o biopsia	≥ 1 g in contenitore senza fissativo o conservante	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in fissativi, campioni inclusi in paraffina
Sangue mestruale	Alcuni mL raccolti in provetta con eparina al 2°-3° giorno del flusso mestruale	Preferibilmente eseguire curettage dell'endometrio	Campione coagulato
Sangue periferico	Direttamente nel flacone da emocoltura specifico per micobatteri	Almeno 2 prelevati contemporaneamente o entro le 24 ore	Campione coagulato o raccolto con EDTA
Urina	Prima urina del mattino (almeno 50 mL), ottenuta anche mediante catetere, per 3 giorni consecutivi	Il mitto intermedio è sconsigliato	Urina delle 24 h, urina da sacca, volumi inferiori a 50 mL

BIBLIOGRAFIA 2

- Migliori GB, Sotgiu G, Rosales-Klintz S, et al. European Union standard for tuberculosis care on treatment of multidrug-resistant tuberculosis following new World Health Organization recommendations. *Eur Respir J* 2018; 52: 1801617 [<https://doi.org/10.1183/13993003.01617-2018>]
 - Solari L., Acuna-Villaorduna C., Soto A., van der Stuyt P., Evaluation of clinical prediction rules for respiratory isolation of patients with suspected pulmonary tuberculosis, 2011, *Int J Tuberc Lung Dis*; 52: 595-603.
 - Colmenero J.D., Jimenez-Mejias M.E., Reguera J.M., Palomino-Nicas J., Ruiz-Mesa J.D., Márquez-Rivas J., Lozano A., Pachón J., Tuberculous vertebral osteomyelitis in the new millennium: still a diagnostic and therapeutic challenge, 2004, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 23:477-483.
 - Mathuram AJ, Michael JS, Turaka VP, Jasmine S, Carey R, Ramya I, et al. Mycobacterial blood culture as the only means of diagnosis of disseminated tuberculosis in advanced HIV infection. *Trop Doct*. 2018; 48:100-2.
 - Barr DA, Kerkhoff AD, Schutz C, Ward AM, Davies GR, Wilkinson RJ, Meintjes G. 2018. HIV-associated Mycobacterium tuberculosis bloodstream infection is underdiagnosed by single blood culture. *J Clin Microbiol* 56:e01914-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01914-17>
 - WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 5: Management of tuberculosis in children and adolescents. Geneva: World Health Organization; 2022 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/352522>, accessed March 2022).
 - WHO operational handbook on tuberculosis Module 5: Management of tuberculosis in children and adolescents. Geneva: World Health Organization; 2022 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/352523>, accessed March 2022)
- European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2018. Stockholm: ECDC; 2018.

8. European Reference Laboratory Network for TB (ERLTB-Net) <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/erltb-net>
9. Alisjahbana B., van Crevel R., Danusantoso H., Gartinah T., Soemantri E.S., Nelwan R.H.H., van der Meer JW., Better patient instruction for sputum sampling can improve microscopic tuberculosis diagnosis, 2005, *Int J Tuberc Lung Dis*; 9:814-817
10. Urbanczik R., Laboratory tests focusing on sputum, 2010, *Int J Tuberc Lung Dis*; 14:1087-1093.
11. Jones F.L. Jr., The relative efficacy of spontaneous sputa, aerosol-induced sputa, and gastric-aspirates in the bacteriologic diagnosis of pulmonary tuberculosis, 1966, *Dis Chest*; 50:403-408.
12. Brown M., Varia H., Basset P., Davidson R.N., Wall R., Pasvol G., Prospective study of sputum induction, gastric washing and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients who are unable to expectorate, 2007, *Clin Infect Dis*; 44:1415-1420
13. Dickson S.J., Brent A., Davidson N.R., Wall R., Comparison of bronchoscopy and gastric washings in the investigation of smear-negative pulmonary tuberculosis, 2003, *Clin Infect Dis*; 37:1649-1653.
14. C.L. Daley, J. Iaccarino, C. Lange et al. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. Guideline 2020
15. B. A. McGrath, S. Ruane, J. McKenna and S. Thomas. Contamination of single-use bronchoscopes in critically ill patients. *Anaesthesia* 2017, 72, 36-41
16. Dania Khalid Saeed, Sadia Shakoor, Seema Irfan, Rumina Hasan, Mycobacterial contamination of bronchoscopes: Challenges and possible solutions in low resource settings, *International Journal of Mycobacteriology*, Volume 5, Issue 4, 2016, Pages 408-411, ISSN 2212-5531, <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.08.002>.
17. CLSI, Laboratory detection and identification of mycobacteria; CLSI guideline M48. Wayne, PA: CLSI; 2018
18. Barnes T.W., Olson E.J., Morgenthaler T.I., Edson R.S., Decker P.A., Ryu J.H., Low yield of microbiologic studies on pleural fluid specimens, 2005, *Chest*; 127: 916-921.
19. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
20. Berzosa M., Tsukayama T., Davies S.F., Debol S.M., Cen Y.Y., Li R., Mallery S., Endoscopic ultrasound-guided fineneedle aspiration for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis, 2010, *Int J Tuberc Lung Dis*; 14:578-584
21. Crump J.A., Reller L.B., Two decades of disseminated tuberculosis at a university medical center: the expanding role of mycobacterial blood culture, 2003, *Clin Infect Dis*; 37:1037-1043.
22. Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo D. M., Frizzera E. *Micobatteriologia Clinica*. II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia
23. Diep NT Nguyen, Trung V Nguyen, Trinh T Dao, Lam T Nguyen, Peter Horby, Kinh V Nguyen, Heiman FL Wertheim. One year experience using mycobacterial blood cultures to diagnose tuberculosis in patients with prolonged fever in Vietnam. *J Infect Dev Ctries*. 2014 December 15; 8(12): 1620-4. doi:10.3855/jidc.4895.

3. Annesso 1 - ESAME MICROSCOPICO

L'esame microscopico è un test diagnostico rapido ed economico per evidenziare la presenza di micobatteri in un campione biologico. Il limite principale del metodo è rappresentato dalla scarsa sensibilità (25-75% rispetto all'esame colturale), dovuta al fatto che per la positività è necessaria la presenza di un numero elevato di micobatteri nel campione (circa 10^4 bacilli/mL). Inoltre, la microscopia è dotata di scarsa specificità, dal momento che le proprietà tintoriali sono comuni anche ad altri microrganismi, non consente di identificare la specie micobatterica e non fornisce informazioni sulla vitalità dei microrganismi. Nonostante non sia più raccomandato come test iniziale per la diagnosi di TB, rimane utilizzato per il monitoraggio della terapia in associazione alla coltura e nell'identificazione di casi altamente bacilliferi.

I micobatteri sono microrganismi difficilmente colorabili a causa della presenza dell'elevato contenuto lipidico della parete batterica. Questa caratteristica fa sì che, diversamente dalla grande maggioranza dei batteri, i micobatteri si colorino poco o per nulla con la colorazione di Gram, mentre sono in grado di legare stabilmente alcuni coloranti in soluzione fenolica, trattenendoli anche se sottoposti a un trattamento di decolorazione molto energico eseguito con una miscela di acido forte e alcol. Tale proprietà è conosciuta come alcol-acido-resistenza.

È possibile effettuare la ricerca microscopica di micobatteri su qualsiasi materiale biologico con la sola eccezione del sangue, in cui l'eventuale carica batterica è solitamente inferiore alla soglia di sensibilità del metodo. Sui campioni clinici l'esame microscopico eseguito direttamente, cioè senza decontaminazione e concentrazione mediante centrifugazione, è sconsigliato, dal momento che riduce ulteriormente la già bassa sensibilità del test. La colorazione per la ricerca di bacilli alcol-acido-resistenti (BAAR), oltre che sui campioni clinici di soggetti con sospetta infezione micobatterica, deve essere eseguita su colonie cresciute in coltura per confermare la presenza di micobatteri.

Due tipi di colorazione sono comunemente impiegate per rilevare BAAR: la colorazione con carbolfucsina e la colorazione con fluorocromi (auramina, auramina-rodamina). A sua volta, la colorazione con carbolfucsina può essere eseguita con il metodo *Ziehl-Neelsen*, in cui i vetrini sono scaldati durante la colorazione, o con il metodo a freddo *Kinyoun*. Le colorazioni con carbolfucsina permettono di evidenziare in maniera ottimale le caratteristiche morfologiche dei microrganismi e sono caratterizzate da maggiore specificità rispetto a quelle con fluorocromi, in confronto alle quali, tuttavia, richiedono un tempo di osservazione maggiore. La lettura dei preparati con fluorocromi richiede un microscopio a fluorescenza e una maggior esperienza da parte dell'operatore, ma comporta una sensibilità maggiore dato che, utilizzando ingrandimenti minori, permette, a parità di tempo, l'osservazione di aree più vaste del preparato. La microscopia a LED ha sostituito la microscopia a fluorescenza per i costi inferiori a parità di risoluzione [1,2].

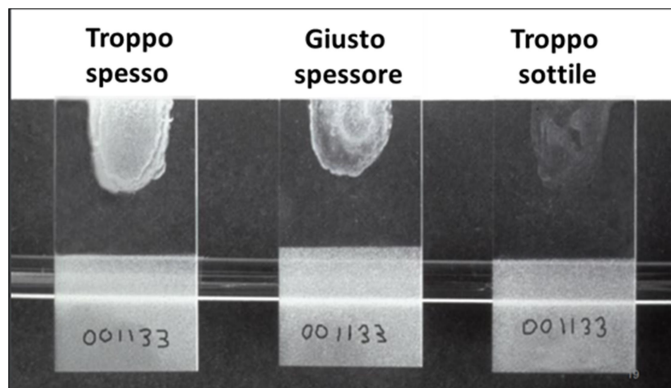
3.1. ESECUZIONE DELLO STRISCIO

Tutte le procedure vanno eseguite in cappa di sicurezza di classe II. La microscopia può essere eseguita anche direttamente da campione biologico a seconda delle possibilità diagnostiche del laboratorio. In questo caso è bene selezionare la parte del campione muco-purulenta ed evitare la parte salivare.

- utilizzare vetrini ben sgrassati, opportunamente contrassegnati con l'identificativo del campione;

• trasferire una porzione del campione sul vetrino utilizzando un'ansa o una pipetta. Distribuire il materiale su una superficie di approssimativamente 1,5 x 2 cm, facendo attenzione che il preparato non risulti eccessivamente spesso o sottile (vedi fig. 1):

Figura 1. Preparazione dello striscio



- per i campioni concentrati (tramite centrifugazione per 15 minuti a 3000 x *g* oppure mediante citocentrifugazione) utilizzare una o due gocce di sedimento;
- qualora si parta da campioni clinici non concentrati occorre selezionare il materiale delle aree necrotico-purulente;
- lasciare asciugare all'aria;
- fissare i vetrini mediante piastra riscaldante (65°-75°C) per almeno due ore.

3.2. COLORAZIONE

Sono commercialmente disponibili e ampiamente usati i coloratori automatici, che consentono di processare un elevato numero di campioni. Tali apparati richiedono reagenti dedicati e sono in grado di realizzare sia la colorazione con carbolfucsina che con fluorocromi. Di seguito sono comunque descritte le procedure manuali.

3.2.1. COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELSEN (CARBOLFUCSINA A CALDO)

Tutte le operazioni vanno eseguite sotto cappa chimica.

Procedimento:

- coprire il vetrino con carbolfucsina di *Ziehl*. Scaldare lentamente, fino alla formazione dei primi vapori, passando sotto il vetrino la fiamma di un batuffolo di cotone impregnato di alcol. Colorare per 5 minuti aggiungendo, se necessario, nuovo colorante in modo che il preparato rimanga costantemente coperto. NB. I vapori che si sviluppano sono tossici;
- lavare con acqua di fonte;
- decolorare con la miscela acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 secondi, fino a quando nel liquido di lavaggio non vi è più traccia di colorante;
- sciacquare il vetrino con acqua di fonte;
- colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi;
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica viene effettuata con obiettivo 100x, ad immersione. I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo, di colore azzurro-blu.

3.2.2. COLORAZIONE DI KINYOUN (CARBOLFUCSINA A FREDDO)

Tutte le operazioni vanno eseguite sotto cappa chimica.

Procedimento:

- coprire il vetrino con carbolfucsina di *Kinyoun*. Colorare per cinque minuti;
- lavare con acqua di fonte;
- decolorare con la miscela acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 secondi, fino a quando nel liquido di lavaggio non vi sia più traccia di colorante;
- lavare con acqua di fonte;
- colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi;
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica viene effettuata con obiettivo 100x, ad immersione. I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore azzurro-blu.

3.2.3. COLORAZIONE FLUOROCROMICA CON AURAMINA E SUE VARIANTI

Procedimento:

- coprire il vetrino con auramina, colorare per 15 minuti senza riscaldare;
- lavare con acqua di fonte;
- decolorare con la miscela acido-alcol per 2 minuti;
- lavare con acqua di fonte;
- 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 attenuando così la fluorescenza di eventuali bacilli alcol-acido-resistenti;
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica va effettuata entro 24 ore (la fluorescenza decade nel tempo); in caso di lettura ritardata conservare i vetrini al buio alla temperatura di 2-4 °C.

L'osservazione dei vetrini viene effettuata utilizzando un microscopio a fluorescenza dotato di lampada a vapori di mercurio o un microscopio a LED; si utilizzano obiettivi da 20x o 40x. I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono fluorescenti in giallo-arancio contro lo sfondo scuro. Varianti della colorazione fluorocromica usano, come colorante primario, una miscela di auramina O e rodamina, che dà ai micobatteri un aspetto dorato, o, come colorante secondario, l'arancio di acridina, che produce uno sfondo rosso tendente all'arancio.

Nei casi dubbi è possibile sovracolorare con carbolfucsina, senza previa decolorazione, un preparato già colorato con fluorocromi.

3.3 OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

Si suggerisce di esaminare il vetrino osservando un numero adeguato di campi microscopici prima di considerarlo negativo (circa 80 campi usando la microscopia a fluorescenza e 300 campi usando la microscopia ottica a immersione). Il metodo di lettura deve garantire l'osservazione di una parte significativa del campione eseguendo una serie di passaggi lungo gli assi maggiore e minore del preparato [1]. I micobatteri tubercolari appaiono come bastoncelli lunghi e sottili (2-8 x 0,5µm), talvolta ricurvi, isolati o più spesso riuniti in gruppetti. Talvolta 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. Raramente possono osservarsi micobatteri ramificati, più spesso tale morfologia è riferibile a presenza di *Nocardia* sp. Qualora, in preparati allestiti da colture in terreno liquido, si osservino fasci serpentiformi alcol-acido-resistenti formati da numerosi bacilli allineati in lunghe file parallele (cordoni), la presenza di *M. tuberculosis* è da ritenersi altamente probabile; un aspetto simile può essere eventualmente osservato anche in presenza di altri micobatteri, quali *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* o *Mycobacterium ulcerans*.

3.4 MICROSCOPIA A LED

Evidenze sperimentali promuovono la microscopia a LED come sostituto di entrambi i metodi convenzionali microscopia a fluorescenza e microscopia di preparati colorati con carbolfucsina. La microscopia a LED facilita l'identificazione dei BAAR, può essere utilizzato con la colorazione con auramina, è conveniente (la durata della lampada è superiore a 10.000 ore), ha bassi requisiti di alimentazione e può essere facilmente introdotto nei centri di microscopia, incluse strutture periferiche. Inoltre, l'intensità della luce può essere facilmente regolata.

Poiché la microscopia basata su LED è stata riconosciuta come un importante sviluppo nella fluorescenza diretta microscopia, l'OMS ha raccomandato che sostituisca la microscopia a fluorescenza convenzionale e che venga introdotta gradualmente come alternativa alla microscopia *Ziehl-Neelsen* convenzionale nei laboratori sia ad alto che a basso carico di lavoro.

3.5 REFERTAZIONE

L'esame microscopico ha un tempo di refertazione massimo di 24 ore lavorative a partire dall'arrivo del campione in laboratorio. In assenza di diagnosi nota di TB, la positività microscopica (confermata da test molecolare per MTB) deve essere comunicata tempestivamente al clinico per permettere l'immediato isolamento del paziente, la cui contagiosità è direttamente proporzionale al numero di bacilli evidenziati. L'esame negativo va refertato come: "Negativo per bacilli alcol-acido-resistenti"; quello positivo deve essere refertato, in base al tipo di colorazione utilizzata e al numero di bacilli alcol-acido resistenti presenti nei campi microscopici osservati a diversi ingrandimenti, come indicato nello schema riportato in tabella 1.

Tabella 1 - Schema di refertazione dell'esame microscopico [1]

BAAR OSSERVATI PER COLORAZIONE A BASE DI:			REFERTO
CARBOLFUCSINA Obiettivo 100x	AURAMINA Obiettivo 20x	AURAMINA Obiettivo 40x	
0	0	0	Negativo
1-2 per 300 campi	1-2 per 30 campi	1-2 per 70 campi	Rari BAAR
1-9 per 100 campi	1-9 per 10 campi	2-18 per 50 campi	Positivo +
1-9 per 10 campi	1-9 per campo	4-36 per 10 campi	Positivo ++
1-9 per campo	10-90 per campo	4-36 per campo	Positivo +++
>9 per campo	>90 per campo	>36 per campo	Positivo ++++

BIBLIOGRAFIA 3

1. Smear microscopy. In: ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2018.
2. Martin I., Pfyffer GE., Parrish N., *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures, in: Carroll K.C., Pfaller MA., Landry M.L., McAdam A.J., Patel R., Richter S.S., Warnock D.W., Manual of clinical microbiology, 12th edition, 2019, ASM Press, Washington DC; 558-575.

Ente del Terzo Settore

4. Annesso 2 - DECONTAMINAZIONE E CULTURA

Se comparata a quella di altri batteri, la crescita dei micobatteri è lenta e la comparsa delle colonie richiede, in condizioni ottimali di incubazione, tempi che variano, a seconda delle specie, da pochi giorni a varie settimane.

I campioni biologici da inoculare in coltura si suddividono in:

- contaminati da flora residente o durante il prelievo, quali ad esempio espettorato, espettorato indotto, aspirato gastrico, tampone laringeo, lavaggio bronco-alveolare, aspirato bronchiale, urine, feci, prelievi autoptici, sangue mestruale;
- non contaminati perché provenienti da siti sterili, quali ad esempio sangue, midollo osseo, liquidi cavitari, liquido cefalo-rachidiano, urine ottenute mediante puntura sovrapubica, aspirati da puntura trans-tracheale.

I campioni contaminati richiedono un processo di decontaminazione, omogeneizzazione e concentrazione. Per i campioni sterili è sufficiente il processo di concentrazione, a meno che il clinico non segnali il sospetto di una concomitante infezione da altri batteri.

4.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni provenienti dalle basse vie respiratorie non richiedono trattamenti diversi dalla normale decontaminazione; altri tipi di campione necessitano invece di procedure particolari [1].

Prelievi biotici

Occorre ridurli in frammenti minuti con forbici o bisturi sterili o *tissue grinder*, quindi sospenderli in soluzione fisiologica e omogeneizzarli, prima di procedere all'esecuzione di esame microscopico e colturale. Nei casi in cui esista la possibilità di un'infezione da germi diversi dai micobatteri (su indicazione clinica o se la richiesta include anche la ricerca dei germi comuni) può essere utile eseguire in doppio l'esame colturale, sia prima che dopo decontaminazione.

Feci

Per l'esame colturale, occorre sospendere una piccola quantità di materiale in 5 mL di brodo Middlebrook 7H9, omogeneizzare al vortex, filtrare per rimuovere i frammenti più grossolani, e decontaminare.

Aspirato gastrico

È necessario, prima della decontaminazione, neutralizzare il pH aggiungendo al campione carbonato di sodio (qualora non sia già stato fatto al momento del prelievo); in alternativa è possibile centrifugare il campione, risospendendo il sedimento in 5-10 mL di tampone fosfato 0,067 M a pH 6,8.

Liquidi cavitari

È sufficiente concentrare per centrifugazione (3000 x g per 15 minuti) e quindi decantare ed eseguire lo striscio microscopico e la semina direttamente dal sedimento.

Campioni raccolti con tampone

Porre il tampone in una provetta contenente 2-3 mL di soluzione fisiologica, agitare al vortex per almeno 30 secondi, recuperare il tampone e scartarlo dopo averlo premuto contro la parete interna della provetta. Concentrare mediante centrifugazione (3000 x g per 15 minuti) la sospensione così ottenuta e seminare il sedimento sia direttamente che previa decontaminazione.

Urine

Il campione va centrifugato a 3000 x g per 15 minuti. Dopo decantazione e risospensione del sedimento in 5 mL di soluzione salina si procede alla decontaminazione.

4.2. DECONTAMINAZIONE

La decontaminazione ha lo scopo di abbattere la carica microbica contaminante ai più bassi livelli possibili affinché non interferisca con la crescita dei micobatteri. La decontaminazione può influire sulla vitalità degli stessi micobatteri, perciò è fondamentale il rispetto dei tempi di contatto tra campione e decontaminante [1, 2, 3].

Nei materiali di origine respiratoria provenienti da pazienti affetti da fibrosi cistica sono spesso presenti varie specie batteriche in carica elevata. La presenza, piuttosto frequente, di *Pseudomonas aeruginosa* in carica elevata, porta pressoché invariabilmente alla contaminazione della coltura per micobatteri. Per ovviare al problema i materiali suddetti vengono sottoposti ad una decontaminazione più energica o a una doppia decontaminazione:

- trattamento preliminare con N-acetil-L-cisteina e idrato di sodio;
- seconda decontaminazione con acido ossalico, da eseguirsi direttamente sul sedimento ottenuto dal trattamento precedente.

Il campione viene successivamente seminato utilizzando i normali terreni di coltura per micobatteri. I trattamenti di decontaminazione riducono la vitalità dei micobatteri per cui una doppia decontaminazione potrebbe causare colture falsamente negative [4].

Colonie di *M. abscessus* vengono spesso rilevate su terreno selettivo utilizzato per l'isolamento di *Burkholderia cepacia* complex nell'espettorato di pazienti affetti da fibrosi cistica (prolungando l'osservazione da 5 a 14 giorni) [5]. Diversi studi mostrano un recupero ottimale di NTM a crescita rapida, soprattutto *M. abscessus*, mediante coltura su un terreno selettivo per NTM a crescita rapida e terreno selettivo per *Burkholderia cepacia*, senza decontaminazione dei campioni di espettorato [6,7].

NALC-IDRATO DI SODIO

È il metodo più adottato e utilizza come agente fluidificante N-acetil-L-cisteina (NALC) e come decontaminante idrato di sodio (NaOH) alla concentrazione del 2% [3].

Esistono prodotti commerciali pronti all'uso che forniscono tutti i reagenti per la decontaminazione secondo la procedura NALC-NaOH. Per i dettagli operativi dei singoli kit si rimanda alle rispettive istruzioni del produttore.

Nell'attività di routine è necessario tenere sotto controllo la percentuale di colture contaminate. La percentuale di contaminazione deve rimanere compresa fra il 3% e il 5%; una percentuale inferiore al 3% denota un processo di decontaminazione troppo energico, una percentuale superiore al 5% è indice di una decontaminazione troppo debole o di una incompleta fluidificazione. Nei terreni liquidi, la cui composizione è estremamente ricca, può risultare difficile rispettare il limite del 5% (non deve superare comunque il 7-8% nei materiali respiratori).

È anche possibile ridecontaminare il sedimento di una coltura liquida contaminata con pari volume di NaOH al 4% e successivamente procedere a un nuovo inoculo.

4.3. ESAME CULTURALE

Gli attuali standard internazionali raccomandano l'uso di terreni liquidi e solidi (per l'isolamento dei micobatteri da campioni biologici) [1, 2, 3, 8].

La coltura in terreno solido può essere eseguita a partire da qualsiasi tipo di materiale biologico. La crescita dei micobatteri avviene più comunemente a 35–37 °C, ma per alcune specie sono richieste temperature di crescita differenti, quali ad esempio 30 o 42 °C.

Qualora si sospetti la presenza di *Mycobacterium haemophilum*, soprattutto nel caso di pazienti gravemente immunodepressi con lesioni cutanee o in presenza di linfadeniti in età pediatrica (che colpiscono anche i bambini immunocompetenti), possono essere utilizzati sia terreni a base di uovo, addizionati con ammonio citrato ferrico all'1%, che terreni agarizzati addizionati con emina allo 0,2% [9].

4.3.1. CULTURA IN TERRENO SOLIDO

I terreni solidi più utilizzati sono a base di uova con verde malachite (Löwenstein-Jensen) o agarizzati (Middlebrook 7H10 e 7H11).

Dopo l'omogeneizzazione e l'eventuale decontaminazione, i campioni vanno inoculati nelle provette di terreno solido, in ragione di 0,10–0,25 mL (2–5 gocce). Le provette devono essere incubate in posizione inclinata, in modo che il materiale possa ricoprire per intero tutta la superficie del becco di clarino, con il tappo lasciato allentato per permettere l'evaporazione della parte liquida dell'inoculo. Dopo qualche giorno, quando il terreno sarà asciutto, occorre serrare il tappo ed è possibile proseguire l'incubazione in posizione verticale.

L'incubazione deve essere protratta per almeno 8 settimane; l'incubazione fino a 12 settimane può rendersi necessaria per permettere la crescita anche dei ceppi disgonici o a crescita particolarmente lenta quali *Mycobacterium ulcerans* e *Mycobacterium malmoense*.

Per campioni di origine cutanea, o quando il clinico sospetti la presenza di particolari specie micobatteriche (*Mycobacterium marinum* o *Mycobacterium ulcerans*), si raccomanda di seminare due set di terreni, di cui uno incubato a 37°C e uno a temperatura inferiore (30–32°C). È consigliabile prolungare i tempi di incubazione oltre le 8 settimane anche nel caso di linfadenopatie in età pediatrica con microscopia positiva e negatività colturale rilevata nei tempi standard. Si raccomanda che tutti i terreni solidi siano esaminati settimanalmente per verificare se vi sia stata crescita di micobatteri e di eventuali contaminanti.

Dalle colonie eventualmente cresciute sulla superficie dei terreni di coltura deve essere allestito un vetrino per differenziare i bacilli alcol-acido-resistenti dagli eventuali contaminanti.

4.3.2. CULTURA IN TERRENO LIQUIDO

Esistono in commercio vari tipi di terreni liquidi per micobatteri che prevedono l'impiego di apparecchi automatici per l'incubazione e la lettura. Il rilevamento di prodotti del metabolismo microbico con metodiche sensibili e automatizzate abbrevia in maniera significativa i tempi di rilevamento dei micobatteri nei campioni clinici.

Il sistema automatico BACTEC™ MGIT™ 960 TB System (Becton Dickinson) è di gran lunga il più diffuso in Italia e nel mondo. Il terreno è contenuto in provette alle quali devono essere aggiunti un supplemento, costituito da una miscela di antibiotici (PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Acido Nalidixico, Trimethoprim, Azlocillina)) che lo rende

selettivo, e un arricchimento (OADC (acido oleico, albumina, destrosio, catalasi)). Una volta inoculate con 0,5 mL di campione decontaminato o, per i materiali provenienti da siti sterili, semplicemente concentrato, le provette vengono caricate nello strumento, dove vengono incubate a una temperatura di 37 °C per 6-8 settimane o fino alla comparsa di positività. Sulle provette che lo strumento segnala come positive deve essere eseguito un preparato microscopico, atto a verificare la presenza o l'assenza di BAAR. Quando lo strumento segnala la scadenza del periodo di incubazione è buona regola, prima di eliminare le provette considerate negative, esaminarle visivamente per individuare l'eventuale presenza di granuli che potrebbero indicare una crescita non rilevata dallo strumento (condizione particolarmente frequente per *M. xenopi* [10]). In quest'ultimo caso occorre eseguire sul sedimento della coltura un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti.

La percentuale di contaminazioni in terreno liquido è solitamente non inferiore al 6-8% [11].

Per i dettagli operativi del sistema MGIT o di altri sistemi eventualmente usati si rimanda alle istruzioni del produttore.

4.4. EMOCOLTURA

Poiché i micobatteri quando sono presenti nel sangue lo sono in bassa carica e in maniera intermittente, il sangue non può essere considerato il materiale di elezione per diagnosticare un'infezione da micobatteri. È perciò importante che la richiesta di emocoltura sia basata su fondati sospetti clinici. La sepsi da micobatteri tubercolari è comunemente associata a tubercolosi miliare, mentre le sepsi da micobatteri non tubercolari sono più frequenti in corso di AIDS o comunque in presenza di grave compromissione del sistema immunitario. In tali pazienti le specie più frequentemente isolate appartengono al *Mycobacterium avium* complex.

Sangue e midollo osseo costituiscono i materiali d'elezione per la diagnosi delle forme disseminate. Per il prelievo di sangue periferico occorre disinfettare la cute con le stesse modalità delle emocolture tradizionali. È possibile effettuare il prelievo direttamente nel flacone di coltura nel caso in cui si impieghino sistemi che prevedono flaconi dedicati. Si consiglia, dove possibile di prelevare almeno 2 emocolture, nello stesso momento oppure entro le 24 ore. Due emocolture aumentano la resa diagnostica, in particolare in pazienti con infezione da HIV [12,13,14].

Oltre al classico prelievo ematico mediante puntura venosa può essere praticata una mielocoltura e, nel caso di sospetta tubercolosi dell'apparato genitale femminile, la coltura del sangue mestruale.

4.5. CONTROLLO DI QUALITÀ

È importante controllare tutti i lotti di terreno, siano essi preparati in laboratorio o acquistati dal commercio; questi ultimi infatti, pur essendo sottoposti a controlli da parte del produttore, potrebbero non essere stati trasportati e conservati in modo ottimale. Terreni di ogni nuovo lotto dovrebbero essere inoculati con una sospensione (torbidità 1 McFarland diluita 1/100) di colture fresche di *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478) e *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841). Un controllo deve essere poi eseguito con un ceppo di *Escherichia coli* (ATCC 25922) per verificare la presenza di inibizione, almeno parziale, dovuta alla presenza di verde

malachite o alla miscela di antibiotici [3]. Tutti i terreni così inoculati vanno incubati con le stesse modalità adottate per i campioni clinici.

Per tenere sotto controllo le contaminazioni, in ogni seduta lavorativa può essere incluso un controllo negativo costituito da acqua sterile. Il controllo deve essere processato insieme ai campioni clinici e inoculato negli stessi terreni. Il campione deve rimanere negativo fino al termine del protocollo di incubazione. Nel caso di comparsa di positività per bacilli alcol-acido resistenti devono essere invalidati tutti i risultati di quel *batch* di campioni. In tal caso, come anche in presenza di contaminazione da flora microbica aspecifica, devono essere introdotte o verificate le seguenti misure correttive [3]:

- revisione approfondita di tutte le procedure;
- controllo della sterilità di tutti i reagenti o preparazione di nuovi reagenti;
- disinfezione delle cappe biologiche di sicurezza.

I laboratori che eseguono la diagnostica micobatteriológica sono tenuti a partecipare a un programma esterno di qualità per ogni aspetto della diagnostica erogata [15]. Fra i programmi di *proficiency* disponibili in commercio, i seguenti valutano le performance delle metodiche impiegate per la coltura dei micobatteri:

- Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), <http://www.instand-ev.de>, spedisce 10 campioni all'anno recapitati in due invii. I tempi di risposta sono abbastanza ristretti (un mese) e richiedono la sola *detection* (positivo o negativo), mentre l'identificazione è opzionale;
- UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (NEQAS), London (UK), <http://www.ukneqasmicro.org.uk>, è distribuito in Italia da Oxoid. Il programma NEQAS invia 4 campioni 3 volte l'anno, è necessario identificare il micobatterio isolato e segnalare il tempo di crescita; la *deadline* per l'invio delle risposte è di circa 3 mesi.

4.6. CROSS-CONTAMINAZIONI

Le cross-contaminazioni si verificano quando, durante la processazione, una coltura viene contaminata da micobatteri provenienti da un campione (positivo) diverso da quello inoculato.

Quando si sospetti la presenza di una contaminazione crociata è raccomandato il ricorso a tecniche di tipizzazione molecolare mediante WGS che sono in grado di accertare se i ceppi incriminati siano o meno identici.

I seguenti riscontri laboratoristici debbono costituire un serio campanello di allarme per far ipotizzare la presenza di contaminazione crociata:

- aumentata incidenza di colture positive da campioni con esame microscopico negativo;
- debole positività colturale di uno o più campioni microscopico-negativi, provenienti da pazienti privi di fondato sospetto clinico, processati in una seduta comprendente un campione fortemente positivo.

4.7. REFERTAZIONE

In caso di negatività refertare: "Negativa la coltura di micobatteri".

In caso di positività refertare: "Positiva la crescita di bacilli alcol-acido-resistenti. Identificazione in corso".

La refertazione delle colture positive deve essere fatta non appena si rileva crescita sul primo dei terreni seminati, di solito il terreno liquido. L'incubazione dell'altro terreno

(solitamente quello solido) va comunque prolungata fino al momento della comparsa di positività o fino al termine del periodo di incubazione.

La contaminazione di una coltura deve essere segnalata quanto prima al clinico, per l'eventuale invio di un nuovo campione.

BIBLIOGRAFIA 4

1. Chiaradonna P., Tronci M. Decontaminazione e coltura. In: Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo D. M., Frizzera E. Micobatteriologia Clinica. II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia.
2. CLSI, Laboratory detection and identification of mycobacteria; CLSI guideline M48. Wayne, PA: CLSI; 2018.
3. ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2018. European Reference Laboratory Network for TB (ERLTB-Net) <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/erltb-net>
4. Stephenson, D.; Perry, A.; Nelson, A.; Robb, A.E.; Thomas, M.F.; Bourke, S.J.; Perry, J.D.; Jones, A.L. Decontamination Strategies Used for AFB Culture Significantly Reduce the Viability of Mycobacterium abscessus Complex in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. Microorganisms 2021, 9, 1597. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081597>.
5. Esther CR Jr, Hoberman S, Fine J, Allen S, Culbreath K, Rodino K, Kerr A, Gilligan P. Detection of rapidly growing mycobacteria in routine cultures of samples from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2011 Apr;49(4):1421-5. doi: 10.1128/JCM.02379-10. Epub 2011 Feb 2. PMID: 21289148; PMCID: PMC3122866.
6. Plongla R, Preece CL, Perry JD, Gilligan PH. 2017. Evaluation of RGM medium for isolation of nontuberculous mycobacteria from respiratory samples from patients with cystic fibrosis in the United States. J Clin Microbiol 55:1469 -1477. <https://doi.org/10.1128/JCM.02423-16>.
7. Preece CL, Wichelhaus TA, Perry A, Jones AL, Cummings SP, Perry JD, Hogardt M. Evaluation of Various Culture Media for Detection of Rapidly Growing Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol. 2016 Jul;54(7):1797-1803. doi: 10.1128/JCM.00471-16. Epub 2016 Apr 20. PMID: 27098962; PMCID: PMC4922094.
8. Pfyffer G.E., Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr., Mycobacterium: general characteristics, isolation, and staining procedures, in: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C., Tenover F.C. Eds., Manual of clinical microbiology, 2003, ASM Press, Washington DC; 532-559.
9. Samra Z., Kaufmann L., Zeharia A., Ashkenazi S., Amir J., Bahar J., Reischl U., Naumann L., Optimal detection and identification of Mycobacterium haemophilum in specimens from pediatric patients with cervical lymphadenopathy, 1999, J Clin Microbiol; 37:832-834.
10. Piersimoni C, Nista D, Bornigia S, Gherardi G. Unreliable detection of Mycobacterium xenopi by the nonradiometric Bactec MGIT 960 culture system. J Clin Microbiol. 2009 Mar;47(3):804-6. doi: 10.1128/JCM.01444-08. Epub 2009 Jan 14. PMID: 19144802; PMCID: PMC2650918.
11. Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti MT., Gesu G., Nista D., Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study, 1999, J Clin Microbiol; 37:3578-3582.
12. Mathuram AJ, Michael JS, Turaka VP, Jasmine S, Carey R, Ramya I, et al.

- Mycobacterial blood culture as the only means of diagnosis of disseminated tuberculosis in advanced HIV infection. *Trop Doct.* 2018;48:100-2.
13. Barr DA, Kerkhoff AD, Schutz C, Ward AM, Davies GR, Wilkinson RJ, Meintjes G. 2018. HIV-associated Mycobacterium tuberculosis bloodstream infection is underdiagnosed by single blood culture. *J Clin Microbiol* 56:e01914-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01914-17>
 14. Diep NT Nguyen, Trung V Nguyen, Trinh T Dao, Lam T Nguyen, Peter Horby, Kinh V Nguyen, Heiman FL Wertheim. One year experience using mycobacterial blood cultures to diagnose tuberculosis in patients with prolonged fever in Vietnam. *J Infect Dev Ctries.* 2014 December 15; 8(12): 1620-4. doi:10.3855/jidc.4895.
 15. Nikolayevskyy V, Hillemann D, Richter E, Ahmed N, van der Werf MJ, Kodmon C, Drobniewski F, Ruesch-Gerdes S; ERLTB-Net Network. External Quality Assessment for Tuberculosis Diagnosis and Drug Resistance in the European Union: A Five Year Multicentre Implementation Study. *PLoS One.* 2016; 11:e0152926.



5. Annesso 3 – IDENTIFICAZIONE MEDIANTE TEST DI AMPLIFICAZIONE

5.1. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE LPA

Lo strumento più affidabile per l'identificazione a livello di specie per i laboratori che non dispongono del sequenziamento è l'utilizzo di sistemi commerciali basati sull'uso di sonde molecolari. Tali sistemi possono essere utilizzati per identificare le specie di *Mycobacterium* partendo da organismi cresciuti in coltura o da campione diretto con microscopia positiva [1, 2, 3, 4]. Esistono vari sistemi commerciali basati sulla ibridizzazione inversa, comunemente conosciuti come LPA (line probe assay), che permettono, con un singolo test, l'identificazione di varie specie in numero variabile a seconda del kit. Questi richiedono l'estrazione e l'amplificazione preventiva del DNA del ceppo da identificare. I singoli kit usano come bersaglio regioni geniche differenti. La possibilità di discriminare tra alcune specie o singole specie all'interno di alcuni gruppi (es. *M. fortuitum* group) non sempre è possibile con tali metodi. È importante anche ricordare che, per alcune delle sonde utilizzate nei vari kit commerciali, sono state segnalate reazioni crociate [5]. Per tale ragione si consiglia una conferma mediante sequenziamento. Per i dettagli operativi dei singoli kit si rimanda alle rispettive istruzioni del produttore.

5.2. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENICO

L'identificazione può essere effettuata mediante WGS utilizzando tecniche di sequenziamento di nuova generazione o sequenziamenti mirati di regioni conservate del genoma mediante tecnica *Sanger*. La prima fornisce informazioni più approfondite ed è da considerare come riferimento, la seconda permette un buon livello di identificazione.

La regione più comunemente sequenziata a fini identificativi è il gene codificante per l'rRNA 16S; altre regioni idonee si trovano nel gene *hsp65*, nella regione interspaziatrice (ITS1) e nel gene *rpoB*. Il sequenziamento del 16S rRNA dà risultati soddisfacenti con le specie a crescita lenta; l'*rpoB* è consigliato per le specie a crescita rapida; l'*hsp65* rappresenta l'alternativa al 16S nel caso in cui quest'ultimo non risulti sufficientemente discriminativo, mentre l'ITS1 è il bersaglio ideale per la differenziazione delle specie all'interno del *M. avium* complex [1, 6, 7, 8].

Le limitazioni del sequenziamento del gene dell'rRNA 16S (standard approvato per l'identificazione e la classificazione) includono l'incapacità di distinguere le sottospecie di *M. abscessus*, nonché l'errata identificazione di *M. chimaera* come *M. intracellulare*; pertanto, sono utilizzati altri geni conservati (ad esempio, *rpoB*, *hsp65* e ITS1). Il sequenziamento viene solitamente eseguito con procedure home-made. Per il gene 16S rDNA esistono in commercio kit "tutto incluso". La soluzione con il miglior rapporto costo/beneficio è, probabilmente, il ricorso a laboratori specializzati che eseguono sequenziamenti su richiesta; in tal caso occorre fornire il DNA da sequenziare e la sequenza dei primer da utilizzare.

Analisi dell'elettroferogramma

L'elettroferogramma costituisce l'output del sequenziatore automatico. Esso consiste in una successione di picchi di colori diversi, corrispondenti alle quattro basi azotate, che riproducono la sequenza del segmento in esame. La qualità dell'elettroferogramma deve essere rigorosamente controllata; in particolare occorre verificare che non vi sia sovrapposizione di picchi e che la decodifica operata dallo strumento sia corretta.

In molti casi l'osservazione visiva permette di risolvere le ambiguità che il sistema non è in grado di interpretare. Un eccellente programma per la gestione e l'archiviazione delle sequenze è MEGA scaricabile gratuitamente da internet (<http://www.megasoftware.net/>).

Interrogazione del database

L'identificazione del microrganismo in esame si raggiunge confrontando la sequenza ottenuta con le sequenze presenti in un database. In aggiunta ai database commerciali ve ne sono alcuni consultabili gratuitamente tramite internet; fra questi l'americano GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.htm>), l'europeo EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) e il giapponese DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), sono perfettamente sovrapponibili dato che, fra di essi, esiste un accordo di condivisione delle sequenze depositate. Una volta inserita una sequenza nell'apposita finestra, il database restituisce un elenco di microrganismi in ordine decrescente di somiglianza con il ceppo in esame e ne riporta la sequenza, appaiata con quella in esame con, evidenziate, le eventuali discordanze. La tecnologia del sequenziamento è notevolmente migliorata negli ultimi anni e consente oggi di ottenere elettroferogrammi di buona qualità anche in contesti non specialistici.

Per quanto riguarda l'interpretazione degli elettroferogrammi per il raggiungimento di una corretta identificazione a livello di specie è necessario avere una buona sequenza e seguire alcune regole, soprattutto per i micobatteri che sono organismi strettamente correlati tra loro a livello genetico.

Partendo da una sequenza di buona qualità, fra le varie identificazioni proposte dal database deve essere considerata accettabile quella con la similarità più elevata a condizione che ricada nei limiti di accettabilità indicati di seguito:

- **16S rRNA** (prime 500 pb) >99,5% (<3 mismatch/500 pb)
- ***rpoB*** (regione V, 700 pb) >97% (<21 mismatch/700 pb)
- ***hsp65*** (Telenti, 400 pb) >97% (<13 mismatch/400 pb)
- **ITS**: >98%

Non sempre l'identificazione che corrisponde alla specie con il più elevato grado di somiglianza è quella corretta; l'esperienza del microbiologo nella risoluzione delle discordanze e nella valutazione del loro significato gioca un ruolo determinante [9]. L'interpretazione delle sequenze richiede conoscenze di micobatteriologia e non può essere demandata all'esecutore della procedura di sequenziamento che ne sia sprovvisto.

Controllo di qualità

Il miglior controllo di qualità del sequenziamento consiste nell'analisi sistematica dei due filamenti *forward* e *reverse* e nella verifica della loro perfetta complementarità.

5.3. PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ

I laboratori di micobatteriologia sono tenuti a partecipare a un programma esterno di qualità per ogni aspetto della diagnostica erogata. Fra i programmi disponibili in commercio, per la valutazione della performance delle metodiche impiegate per l'identificazione dei micobatteri:

- Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), <http://www.instand-ev.de>, spedisce otto ceppi all'anno recapitati in due invii. I tempi di risposta sono abbastanza ristretti (50 giorni circa).

UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (NEQAS), London (UK), <http://www.ukneqasmicro.org.uk>, è distribuito in Italia da Oxoid. Il programma NEQAS invia 4 campioni 3 volte l'anno, è necessario identificare il micobatterio isolato (tubercolare o non tubercolare) e segnalare il tempo di crescita; la deadline per l'invio delle risposte è di circa 3 mesi.

BIBLIOGRAFIA 5

1. ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2018
2. Richter E., Weizenegger M., Rüscher-Gerdes S., Niemann S., Evaluation of GenoType MTBC assay for differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates, 2003, J Clin Microbiol; 41:2672-2675.
3. Russo C., Tortoli E., Menichella D., Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species, 2006, J Clin Microbiol; 44:334-339.
4. Turenne C.Y., Tschetter L., Wolfe J., Kabani A., Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species, 2001, J Clin Microbiol; 39:3637-3648
5. Tortoli E., Pecorari M., Fabio G., Messinò M., Fabio A., Commercial DNA-probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species, 2009, J Clin Microbiol; 48:307-310
6. Kirschner P., Springer B., Vogel U., Meier A., Wrede A., Kiekenbeck M., Bange F.C., Böttger E.C., Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2- year experience in a clinical laboratory, 1993, J Clin Microbiol; 31:2882-2889
7. McNabb A., Eisler D., Adie K., Amos M., Rodrigues M., Stephens G., Black W.A., Isaac-Renton J., Assessment of partial sequencing of the 65-kiloDalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources, 2004, J Clin Microbiol; 42:3000-3011
8. Roth A., Fisher M., Hamid M.E., Michalke S., Ludwig W., Mauch H., Differentiation of 5 phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequence, 1998, J Clin Microbiol; 36:139-147
9. Tortoli E., Mariottini A., Mazzarelli G., Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification, 2003, J Clin Microbiol; 41:4418-4420

6. Annesso 4 - IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF (MALDI-TOF MS)

L'utilizzo del MALDI-TOF MS a livello sperimentale per l'identificazione dei Micobatteri ha avuto inizio nel primo decennio del 2000, successivamente è stato progressivamente adottato nella routine diagnostica micobatteriológica [1-2].

Attualmente sono disponibili in commercio diverse piattaforme marcate CE-IVD che consentono l'identificazione di micobatteri sia tubercolari che NTM. Ogni piattaforma presenta propri criteri di interpretazione dei risultati e capacità di identificare un numero più o meno elevato di specie [3-6]. L'identificazione microbica può essere effettuata a partire da colture pure ottenute da terreni sia liquidi che solidi [4,7]. Per poter procedere all'acquisizione degli spettri d'onda è necessario uno step preliminare di inattivazione cellulare e di estrazione delle componenti proteiche. In letteratura sono riportati numerosi protocolli *in-house* basati sull'inattivazione termica, chimica o meccanica e sono ora disponibili anche alcuni kit commerciali pronti all'uso [3,7-9]. Una volta inattivato ed estratto, il ceppo viene depositato su uno spot di una apposita piastra-target e cristallizzato con l'aggiunta della matrice. La piastra, inserita nella camera di ionizzazione, viene irradiata con un raggio laser che vaporizza il campione. Gli spettri d'onda, generati dall'analisi del rapporto massa/carica elettrica di ogni singola particella, vengono confrontati con un database di spettri di specie note identificando il ceppo microbico.

Il tempo complessivo per ottenere i risultati è differente a seconda dei protocolli e delle piattaforme utilizzate e può variare da circa un'ora a poco meno di due [8,10].

In confronto ai metodi genotipici, i vantaggi dell'applicazione di tale metodica sono rappresentati dalla semplicità di utilizzo, dalla rapidità di ottenimento dei risultati, e dai costi contenuti [10]. Inoltre, il sempre più diffuso accesso alle piattaforme MALDI-TOF MS nei laboratori di Microbiologia Clinica consente una distribuzione più capillare dei centri in grado di identificare rapidamente i micobatteri.

Rispetto alle metodiche convenzionali genotipiche basate sulla ibridizzazione inversa (LPA), un ulteriore vantaggio dell'applicazione del MALDI-TOF MS è rappresentato dal numero di specie potenzialmente identificabili. Attualmente sono disponibili library estese in grado di riconoscere fino a 182 differenti specie, con la possibilità di ampliarne ulteriormente il numero mediante l'acquisizione *in-house* di nuovi spettri [11].

La capacità di discriminare tra specie e sottospecie in particolare all'interno della specie *M. abscessus*, del *M. avium* complex (MAC) e del *M. fortuitum* group, al contrario, rappresenta un limite di tale metodica. Ciò è dovuto, analogamente a quanto riscontrato per altri batteri, alla presenza di spettri d'onda molto simili tra loro. Tuttavia, le potenzialità di tale tecnologia nel discriminare all'interno di gruppi sono state, e sono ancora oggi, oggetto di studio, con risultati promettenti [12]. Recentemente, un nuovo algoritmo di analisi degli spettri è stato introdotto e validato per la distinzione di specie del MAC [13]. All'interno del percorso diagnostico delle micobatteriosi il MALDI-TOF MS si aggiunge alle metodiche genotipiche come strumento di identificazione rapida da esame colturale positivo.

Recenti studi sull'analisi mediante MALDI-TOF MS della porzione lipidica delle membrane batteriche e del suo utilizzo a polarità negativa aprono ulteriori sviluppi nell'applicazione di tale metodica sia per l'identificazione che per lo studio del profilo di antibiotico resistenza [14-15].

BIBLIOGRAFIA 6

1. Lefmann M, Honisch C, Böcker S, Storm N, von Wintzingerode F, Schlötelburg C, Moter A, van den Boom D, Göbel UB. Novel mass spectrometry-based tool for genotypic identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan;42(1):339-46. doi: 10.1128/JCM.42.1.339-346.2004. PMID: 14715774; PMCID: PMC321663.
2. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One.* 2011;6(9):e24720. doi: 10.1371/journal.pone.0024720. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21935444; PMCID: PMC3172293.
3. Wilen CB, McMullen AR, Burnham CA. Comparison of Sample Preparation Methods, Instrumentation Platforms, and Contemporary Commercial Databases for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2015 Jul;53(7):2308-15. doi: 10.1128/JCM.00567-15. Epub 2015 May 13. PMID: 25972426; PMCID: PMC4473241.
4. Leyer C, Gregorowicz G, Mougari F, Raskine L, Cambau E, de Briel D. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria from Solid and Liquid Culture Media. *J Clin Microbiol.* 2017 Jul;55(7):2045-2054. doi: 10.1128/JCM.00006-17. Epub 2017 Apr 19. PMID: 28424252; PMCID: PMC5483906.
5. Song J, Yoon S, In Y, Kim D, Lee H, Yong D, Lee K. Substantial Improvement in Nontuberculous Mycobacterial Identification Using ASTA MicroIDSys Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry with an Upgraded Database. *Ann Lab Med.* 2022 May 1;42(3):358-362. doi: 10.3343/alm.2022.42.3.358. PMID: 34907106; PMCID: PMC8677478.
6. Rodriguez-Temporal D, Alcaide F, Mareković I, O'Connor JA, Gorton R, van Ingen J, Van den Bossche A, Héry-Arnaud G, Beauruelle C, Orth-Höller D, Palacios-Gutiérrez JJ, Tudó G, Bou G, Ceyssens PJ, Garrigó M, González-Martin J, Greub G, Hrabak J, Ingebreetsen A, Mediavilla-Gradolph MC, Oviaño M, Palop B, Pranada AB, Quiroga L, Ruiz-Serrano MJ, Rodríguez-Sánchez B. Multicentre study on the reproducibility of MALDI-TOF MS for nontuberculous mycobacteria identification. *Sci Rep.* 2022 Jan 24;12(1):1237. doi: 10.1038/s41598-022-05315-7. PMID: 35075208; PMCID: PMC8786948.
7. Pastrone L, Curtoni A, Criscione G, Scaiola F, Bottino P, Guarrasi L, Iannaccone M, Timke M, Costa C, Cavallo R. Evaluation of Two Different Preparation Protocols for MALDI-TOF MS Nontuberculous Mycobacteria Identification from Liquid and Solid Media. *Microorganisms.* 2023; 11(1):120. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010120>
8. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceyssens PJ, Coll P, Corcoran D, Fangous MS, González-Álvarez I, Gorton R, Greub G, Hery-Arnaud G, Hrabak J, Ingebreetsen A, Lucey B, Mareković I, Mediavilla-Gradolph C, Monté MR, O'Connor J, O'Mahony J, Opota O, O'Reilly B, Orth-Höller D, Oviaño M, Palacios JJ, Palop B, Pranada AB, Quiroga L, Rodríguez-Temporal D, Ruiz-Serrano MJ, Tudó G, Van den Bossche A, van Ingen J, Rodriguez-Sanchez B; European Study Group on Genomics and Molecular Diagnosis (ESGMD). How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2018 Jun;24(6):599-603. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.012. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29174730.
9. Rindi L, Puglisi V, Franconi I, Fais R, Lupetti A. Rapid and Accurate Identification of Nontuberculous Mycobacteria Directly from Positive Primary MGIT Cultures by

- MALDI-TOF MS. *Microorganisms*. 2022 Jul 18;10(7):1447. doi: 10.3390/microorganisms10071447. PMID: 35889166; PMCID: PMC9317365.
10. Ge MC, Kuo AJ, Liu KL, Wen YH, Chia JH, Chang PY, Lee MH, Wu TL, Chang SC, Lu JJ. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017 Oct;50(5):662-668. doi: 10.1016/j.jmii.2016.06.002. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27426930.
 11. Toney NC, Zhu W, Jensen B, Gartin J, Anderson K, Lonsway D, Karlsson M, Rasheed JK. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *J Clin Microbiol*. 2022 Sep 21;60(9):e0021722. doi: 10.1128/jcm.00217-22. Epub 2022 Aug 15. PMID: 35969171; PMCID: PMC9491183.
 12. Bagnarino J, Barbarini D, Russello G, Siciliano M, Monzillo V, Baldanti F, Carretto E. Mycobacterium chimaera Identification Using MALDI-TOF MS Technology: A Practical Approach for the Clinical Microbiology Laboratories. *Microorganisms*. 2022 Jun 9;10(6):1184. doi: 10.3390/microorganisms10061184. PMID: 35744702; PMCID: PMC9228860.
 13. Epperson LE, Timke M, Hasan NA, Godo P, Durbin D, Helstrom NK, Shi G, Kostrzewa M, Strong M, Salfinger M. Evaluation of a Novel MALDI Biotyper Algorithm to Distinguish Mycobacterium intracellulare From Mycobacterium chimaera. *Front Microbiol*. 2018 Dec 18;9:3140. doi: 10.3389/fmicb.2018.03140. PMID: 30619208; PMCID: PMC6305299.
 14. Solntceva V, Kostrzewa M, Larrouy-Maumus G. Detection of Species-Specific Lipids by Routine MALDI TOF Mass Spectrometry to Unlock the Challenges of Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 4;10:621452. doi: 10.3389/fcimb.2020.621452. PMID: 33634037; PMCID: PMC7902069.
 15. Shi J, He G, Ning H, Wu L, Wu Z, Ye X, Qiu C, Jiang X. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the detection of drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in re-treated patients. *Tuberculosis (Edinb)*. 2022 Jul;135:102209. doi: 10.1016/j.tube.2022.102209. Epub 2022 Apr 30. PMID: 35550524.

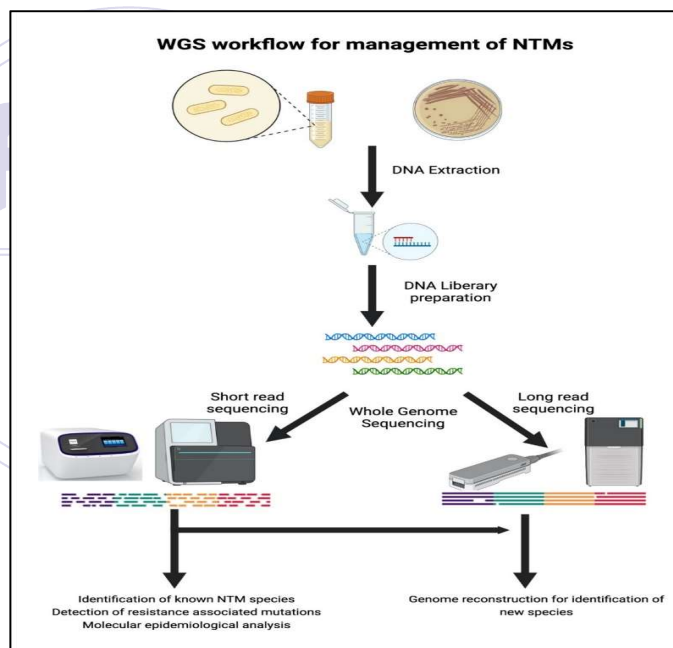
7. Annesso 5 - IL WGS NELLA GESTIONE DELLE INFEZIONI DA NTM

Le infezioni causate da micobatteri non tubercolari (NTM) stanno diventando un problema emergente. Il metodo di sequenziamento dell'intero genoma (WGS) è oggi componente essenziale della diagnostica nei laboratori di micobatteriologia clinica. L'uso di questa tecnologia ha contribuito alla caratterizzazione di nuove specie di micobatteri, nonché all'identificazione di mutazioni geniche che codificano fattori di resistenza e virulenza. I dati di sequenziamento dell'intero genoma permettono inoltre di tracciare i percorsi di trasmissione causati da NTM.

7.1. WGS NELLA DIAGNOSTICA DI NTM

La tecnologia WGS rende possibile la ricostruzione tassonomica e l'identificazione di famiglie specifiche di geni nel genere *Mycobacterium* che possono essere utilizzati per lo sviluppo di nuovi test diagnostici rapidi. La tecnologia WGS permette l'identificazione di NTM rari, il cui significato clinico è fortemente sottovalutato, non venendo riconosciuti nei laboratori che utilizzano metodiche di routine (Fig. 1).

Figura 1 - Rappresentazione schematica della procedura metodologica WGS.



Nella prima fase, il DNA viene estratto dalle colonie cresciute su un terreno di coltura solido o liquido. Successivamente, vengono preparate le librerie per il sequenziamento a lettura corta o lunga.

Nell'ultima fase, i dati di sequenziamento vengono analizzati per l'identificazione del genotipo, dei marcatori di resistenza, per l'analisi epidemiologica molecolare e per l'assemblaggio di genomi completi nel caso di nuove specie NTM.

Confrontando l'efficacia di WGS per la classificazione degli NTM rispetto ai tradizionali LPA, i risultati hanno confermato l'elevata concordanza dei metodi, di cui il sequenziamento ha mostrato il più alto potere discriminatorio, anche all'interno dei complessi (importante soprattutto all'interno di *M. avium* complex e della specie *M. abscessus*) e per l'identificazione di specie rare [2]. Ciò è dovuto al numero limitato di geni amplificati inclusi nei test LPA e alla maggiore omologia tra specie micobatteriche

rispetto ad altre specie batteriche [3]. Lo svantaggio di WGS rispetto al LPA è che richiede tempi di refertazione più lunghi (3-15 giorni). Allo stesso modo, è stata dimostrata la concordanza del 100% del WGS e dei metodi genetici molecolari classici (PCR e sequenziamento diretto) nella diagnostica di *M. avium* subsp. *hominissuis*, *M. intracellulare* e *M. abscessus* [4].

Il vantaggio del WGS è stato dimostrato anche nella gestione delle infezioni multiple da NTM, la cui diagnosi è necessaria per la corretta impostazione del trattamento [5]. Un recente studio che analizza i genomi degli isolati di *M. abscessus* con WGS ha rivelato la molteplicità delle sottopopolazioni con diversi profili di resistenza antimicrobica nei bambini con fibrosi cistica (FC). I risultati di questo studio sono importanti anche per la diagnosi clinica della malattia, in quanto hanno confermato una maggiore diversità di *M. abscessus* nei campioni provenienti da polmoni, ferite toraciche e liquido pleurico rispetto all'espettorato [6].

I dati di sequenziamento hanno fornito una classificazione più dettagliata delle sottospecie e dei (sotto)gruppi nelle colture miste rispetto ai metodi usati convenzionalmente [7-9]. WGS ha anche contribuito alla scoperta di un'elevata diversità interspecie e intraspecie di *M. avium* complex. Questi risultati sottolineano l'utilità del WGS in ambito clinico, poiché le sonde commerciali risolvono *M. avium* solo a livello del complex [10]. Per scopi diagnostici e per prescrivere una terapia appropriata, è necessario identificare e classificare nuove specie/sottospecie di NTM [11,12]. La descrizione dei genomi completi dei nuovi NTM richiede una combinazione sequenziamento mediante piattaforme che eseguono di letture brevi (ad es. Illumina MiSeq, San Diego, CA, USA) e letture lunghe (ad es. MinION, Oxford, Regno Unito; PacBio SMRT, Pacific Biosciences, CA, USA), (Fig. 1 e Tab. 1) [13]. Il sequenziamento a lettura corta è caratterizzato da un'elevata precisione ma non fornisce informazioni sul genoma completo (incluse regioni ricche di G + C, ricombinazione, regioni PE/PPE ripetitive, delezioni e inserzioni (indels)) [14]. Al contrario, le tecnologie di sequenziamento a lettura lunga hanno aumentato le lunghezze di lettura da 100 a 1000 volte con una precisione leggermente inferiore rispetto alle piattaforme NGS e possono coprire regioni di ripetizione molto più grandi rispetto a NGS, permettendo l'assemblaggio del genoma [15].

Tabella 1 – Confronto delle piattaforme di sequenziamento utilizzate per l'assemblaggio del genoma di nuove specie NTM.

Sequencing Platform	Lunghezza di lettura (bp)	Output	Accuratezza	Vantaggi
Illumina MiSeq	25-300	>50 Gb	>99%	Alta qualità di lettura Quantità inferiore di DNA Basso costo per campione
Ion PGM™	<400	30-2 Gb	<98%	Alta qualità di lettura
MinION	short to ultra-long (>4 Mb) reads	300-15 Gb	>95%	Risoluzioni di regioni ripetitive, di regioni ricche di G + C e indels Portatile
PacBio RS II (Single molecule real-time)	>20,000	1-10 Gb	>99.999%	Alta qualità di lettura Risoluzioni di regioni ripetitive, di regioni ricche di G + C e di indels

7.2. WGS E PREVISIONE DELLA SENSIBILITÀ ANTIMICROBICA

Ad oggi l'antibiogramma fenotipico per gli NTM è poco standardizzato. Come per la tubercolosi, l'approccio genotipico potrebbe evidenziare i determinati di resistenza ai farmaci anche negli NTM. I test LPA, ad esempio il test GenoType NTM-DR (Hain Lifescience, Germania), sono disponibili sia per l'identificazione che per la rilevazione della resistenza alla claritromicina e all'amikacina. Tuttavia, i target inclusi in questi test sono limitati e il WGS può identificare un ampio spettro di mutazioni associate a farmacoresistenza. Ad oggi non abbiamo database dettagliati per identificare i geni associati a resistenza negli NTM ed il campo è in continua evoluzione

Per beneficiare dei vantaggi del sequenziamento dell'intero genoma, è necessario che si verifichino ulteriori progressi nella comprensione ed identificazione dei meccanismi di resistenza, associati a dati di outcome clinici (Tab. 2).

Tabella 2 - Vantaggi, svantaggi e sviluppi futuri di test di sensibilità fenotipico e WGS

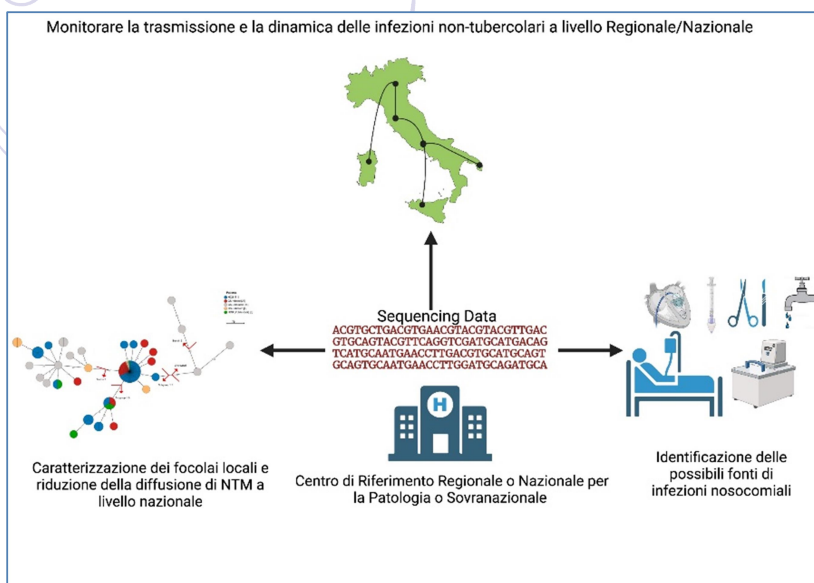
	Vantaggi	Svantaggi	Sviluppi futuri
Test di sensibilità fenotipico	• Metodo approvato • Riproducibilità • Misurazione diretta delle sensibilità • Interpretazione largamente condivisa	• TAT lungo • Requisiti di incubazione variabili (tempo e temperatura) • Calibrazione complicata dell'inoculo • Risultati incoerenti • Risultati dipendenti dalla esperienza tecnica • La vera MIC potrebbe essere tra due concentrazioni • Scarsa correlazione tra sensibilità dei farmaci in vitro ed esito clinico	• Ricerche che dimostrano l'importanza clinica delle MIC discordanti • Possibilità di poter testare nuovi farmaci in piastra
WGS	• Identifica più mutazioni rispetto ai test genotipici • Riduzione del TAT • Concorde tra fenotipico e WGS • Skill set ampiamente disponibile • Accessibile nei paesi a basso e medio reddito • Può essere usato con "machine learning" (apprendimento automatico del software) senza l'utilizzo di database di geni di resistenza noti	• Risultati di sensibilità dedotti • Mancanza di database che possono prevedere con precisione la resistenza • Richiede attrezzature e software costosi • Richiede un bioinformatico esperto • Il DNA deve essere estratto da colture positive e non può essere eseguito direttamente da campioni primari • L'impatto del WGS sull'esito del trattamento degli NTM è sconosciuto	• Progressi nella previsione più accurata di resistenza in NTM mediante database • Sviluppo di modelli di "machine learning" (apprendimento automatico del software) per NTM • Identificazione di tutte le mutazioni associate ai nuovi farmaci • Necessità di studi clinici che descrivono il valore che WGS aggiunge al processo decisionale • Valutare il rapporto costo beneficio

7.3. LE PROSPETTIVE DEL WGS NEL TRACCIARE LE INFEZIONI NOSOCOMIALI DA NTM

Al giorno d'oggi, gli NTM sono classificati come patogeni nosocomiali con manifestazioni cliniche e fonti ospedaliere di infezione [16]. Il loro adattamento all'ambiente ospedaliero deriva dalla loro resistenza ai disinfettanti e agli sterilizzanti, dal basso fabbisogno di nutrienti e dalla capacità di formare un biofilm. Queste infezioni nosocomiali sono solitamente extrapolmonari: infezioni del torrente circolatorio, infezioni della ferita chirurgica, infezioni associate alle protesi, ecc. [17].

La genotipizzazione dei singoli ceppi di NTM è fondamentale per tracciare i focolai nosocomiali e le indagini epidemiologiche. I metodi di tipizzazione precedentemente preferiti, inclusi biotipizzazione, sierotipizzazione e antibiogrammi, non vengono più eseguiti nei laboratori di riferimento a causa del loro insufficiente potere discriminatorio. Le attuali tecniche di genotipizzazione basate sul sequenziamento dell'rRNA 16S, elettroforesi su gel a campo pulsato, VNTR e spoligotipizzazione o tipizzazione plasmidica, sono relativamente facili da eseguire in un breve lasso di tempo e richiedono solo attrezzature disponibili nella maggior parte dei laboratori [18]. Tuttavia, queste tecniche mostrano alcune limitazioni nel riconoscere somiglianze e differenze tra ceppi vicini filogeneticamente simili, che si riflettono nel disallineamento di questi ceppi all'interno dei cluster e nell'incapacità di identificare il loro antenato comune [19,20]. Studi recenti hanno confermato che il WGS mostra un potere discriminatorio più elevato e un'ampia gamma di usi nell'analisi epidemiologica molecolare rispetto alle attuali tecniche di genotipizzazione (Fig. 2) [21,22].

Figura 2. Il WGS nell'epidemiologia molecolare delle infezioni da NTM.

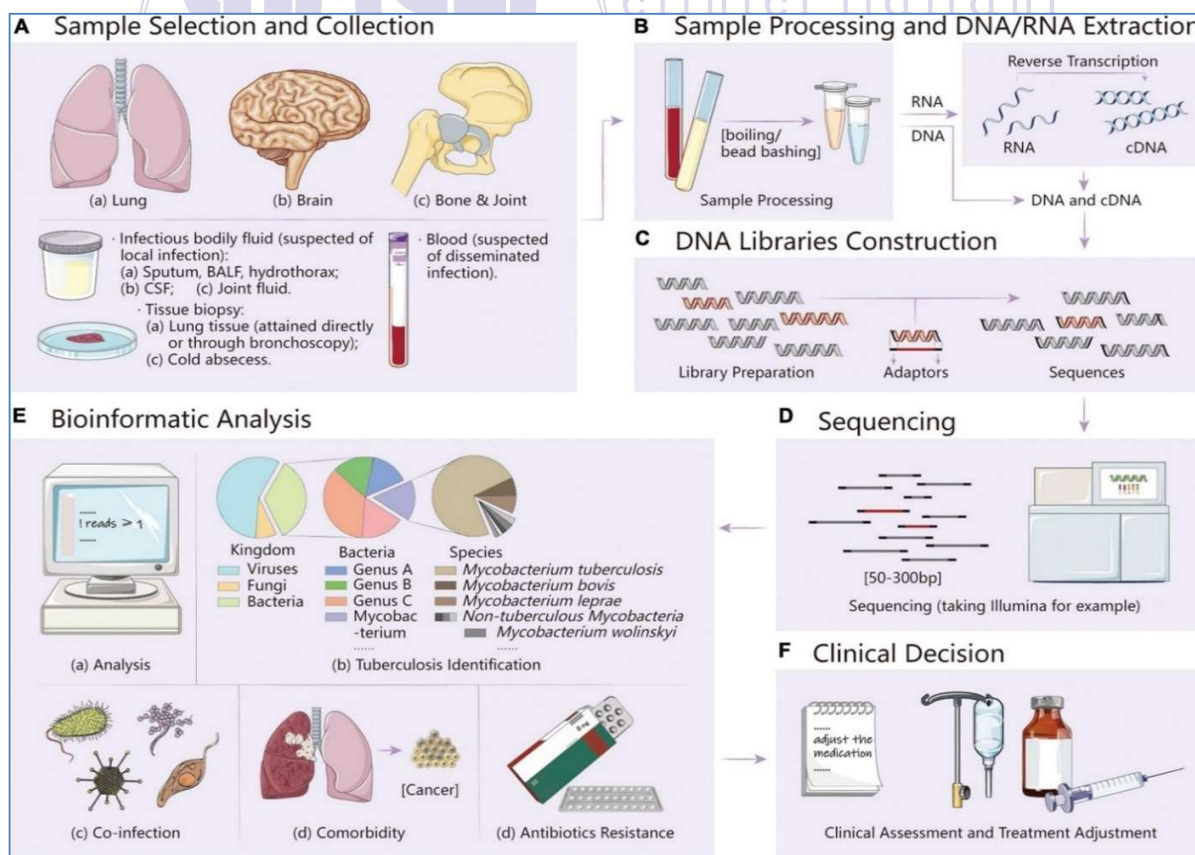


I dati di sequenziamento possono essere utilizzati per descrivere la diffusione e la dinamica delle infezioni da NTM, per caratterizzare i focolai locali e anche per identificare le fonti di infezione nelle strutture ospedaliere.

7.4. LE TECNOLOGIE DI SEQUENZIAMENTO NELLA GESTIONE DELLE INFEZIONI DA NTM

Con lo sviluppo della tecnologia di sequenziamento, il sequenziamento metagenomico di nuova generazione (mNGS) ha iniziato a mostrare potenzialità come tecnologia sensibile e specifica per la determinazione delle specie e dei principali determinanti di resistenza da campione clinico [23]. Dopo aver raccolto campioni idonei, il flusso di lavoro del laboratorio può essere suddiviso approssimativamente in tre fasi, vale a dire l'estrazione del DNA/RNA, la preparazione della libreria e il sequenziamento. A questo segue l'analisi bioinformatica per generare il report finale. Brevi procedure bioinformatiche iniziano principalmente da file FASTQ di input non elaborati, seguiti da filtraggio di qualità e bassa complessità, sottrazione del materiale genetico umano e identificazione di microrganismi presenti nel campione. (Fig 3).

Figura 3 - (A) Selezione e raccolta del campione. I liquidi e i tessuti infettivi sono prelevati dietro valutazione medica. (B - D) Procedure sperimentali di mNGS, che includono principalmente la manipolazione dei campioni e l'estrazione di DNA/RNA, la costruzione di librerie di DNA e il sequenziamento. (E) Analisi bioinformatica di mNGS. Con la modifica della pipeline di analisi, è possibile determinare contemporaneamente la tubercolosi, la co-infezione, la comorbidità e la resistenza agli antibiotici. (F) Decisione clinica. Dopo aver ottenuto il risultato, la valutazione clinica e l'adeguamento del trattamento possono essere effettuati tempestivamente. (ref: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.802719>)



BIBLIOGRAFIA 7

1. Chopra, K.; Sidiq, Z.; Hanif, M.; Dwivedi, K.K. Advances in the diagnosis of tuberculosis- Journey from smear microscopy to whole genome sequencing. *Indian J. Tuberc.* 2020, 67, S61-S68.
2. Quan, T.P.; Bawa, Z.; Foster, D.; Walker, T.; Elías, C.D.O.; Rathod, P.; Iqbal, Z.; Bradley, P.; Mowbray, J.; Walker, A.S.; et al. Evaluation of Whole-Genome Sequencing for Mycobacterial Species Identification and Drug Susceptibility Testing in a Clinical Setting: A Large-Scale Prospective Assessment of Performance against Line Probe Assays and Phenotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2018, 56, e01480-17.
3. Hoshino, Y.; Suzuki, K. Differential diagnostic assays for discriminating mycobacteria, especially for nontuberculous mycobacteria: What does the future hold? *Future Microbiol.* 2015, 10, 205-21.
4. Yoon, J.-K.; Kim, T.S.; Kim, J.-I.; Yim, J.-J. Whole genome sequencing of Nontuberculous Mycobacterium (NTM) isolates from sputum specimens of co-habiting patients with NTM pulmonary disease and NTM isolates from their environment. *BMC Genom.* 2020, 21, 1-7.
5. Daniel-Wayman, S.; Abate, G.; Barber, D.L.; Bermudez, L.E.; Coler, R.N.; Cynamon, M.H.; Daley, C.L.; Davidson, R.M.; Dick, T.; Floto, R.A.; et al. Advancing Translational Science for Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Infections. A Road Map for Research. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019, 199, 947-951.
6. Shaw, L.P.; Doyle, R.M.; Kavalinaite, E.; Spencer, H.; Balloux, F.; Dixon, G.; Harris, K. Children with Cystic Fibrosis Are Infected with Multiple Subpopulations of Mycobacterium abscessus With Different Antimicrobial Resistance Profiles. *Clin. Infect. Dis.* 2019, 69, 1678-1686.
7. Pfeiffer, W.; Braun, J.D.; Burchell, J.; Witte, C.L.; Rideout, B.A. Whole-genome analysis of mycobacteria from birds at the San Diego Zoo. *PLoS ONE* 2017, 12, e0173464.
8. Khieu, V.; Ananta, P.; Kaewprasert, O.; Laohaviroj, M.; Namwat, W.; Faksri, K. Whole-Genome Sequencing Analysis to Identify Infection with Multiple Species of Nontuberculous Mycobacteria. *Pathogens* 2021, 10, 879.
9. Ghodousi, A.; Borroni, E.; Peracchi, M.; Palù, G.; Fallico, L.; Rassu, M.; Manfrin, V.; Mantegani, P.; Monzillo, V.; Manganelli, R.; et al. Genomic analysis of cardiac surgery-associated Mycobacterium chimaera infections in Italy. *PLoS ONE* 2020, 15, e0239273.
10. Operario, D.J.; Pholwat, S.; Koepfel, A.F.; Prorock, A.; Bao, Y.; Sol-Church, K.; Scheurenbrand, M.; Poulter, M.; Turner, S.; Parikh, H.I.; et al. Mycobacterium avium Complex Diversity within Lung Disease, as Revealed by Whole-Genome Sequencing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019, 200, 393-396.
11. Tortoli, E.; Kohl, T.A.; Brown-Elliott, B.A.; Trovato, A.; Leao, S.; Garcia, M.J.; Vasireddy, S.; Turenne, C.Y.; Griffith, D.E.; Philley, J.V.; et al. Emended description of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and Mycobacterium abscessus subsp. bolletii and designation of Mycobacterium abscessus subsp. massiliense comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016, 66, 4471-4479.
12. Kuge, T.; Fukushima, K.; Matsumoto, Y.; Abe, Y.; Akiba, E.; Haduki, K.; Saito, H.; Nitta, T.; Kawano, A.; Kawasaki, T.; et al. Pulmonary disease caused by a newly identified mycobacterium: Mycolicibacterium toneyamachuris: A case report. *BMC Infect. Dis.* 2020, 20, 1-5.

13. Bouso, J.M.; Planet, P.J. Complete nontuberculous mycobacteria whole genomes using an optimized DNA extraction protocol for long-read sequencing. *BMC Genom.* 2019, 20, 793.
14. Bainomugisa, A.; Duarte, T.; Lavu, E.; Pandey, S.; Coulter, C.; Marais, B.J.; Coin, L. A complete high-quality MinION nanopore assembly of an extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage strain identifies novel variation in repetitive PE/PPE gene regions. *Microb. Genom.* 2018, 4, e000188. [Google Scholar] [CrossRef]
15. Tyson, J.R.; O'Neil, N.; Jain, M.; Olsen, H.E.; Hieter, P.; Snutch, T.P. MinION-based long-read sequencing and assembly extends the *Caenorhabditis elegans* reference genome. *Genome Res.* 2018, 28, 266–274.
16. Nishiuchi, Y.; Iwamoto, T.; Maruyama, F. Infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. *Front. Med.* 2017, 4, 27
17. Shakoor, S.; Owais, M.; Hasan, R.; Irfan, S. Nosocomial and Healthcare-Associated NTM Infections and Their Control. In *Nontuberculous Mycobacteria (NTM): Microbiological, Clinical and Geographical Distribution*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 177–190. ISBN 9780128146934.
18. Jamieson, F.B.; Teatero, S.; Guthrie, J.L.; Neemuchwala, A.; Fittipaldi, N.; Mehaffy, C. Whole-Genome Sequencing of the *Mycobacterium tuberculosis* Manila Sublineage Results in Less Clustering and Better Resolution than Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable-Number Tandem-Repeat (MIRU-VNTR) Typing and Spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52, 3795–3798.
19. Trewby, H.; Wright, D.; Breadon, E.L.; Lycett, S.J.; Mallon, T.R.; McCormick, C.; Johnson, P.; Orton, R.J.; Allen, A.R.; Galbraith, J.; et al. Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. *Epidemics* 2016, 14, 26–35.
20. Price-Carter, M.; Brauning, R.; De Lisle, G.W.; Livingstone, P.; Neill, M.; Sinclair, J.; Paterson, B.; Atkinson, G.; Knowles, G.; Crews, K.; et al. Whole Genome Sequencing for Determining the Source of *Mycobacterium bovis* Infections in Livestock Herds and Wildlife in New Zealand. *Front. Vet. Sci.* 2018, 5, 272.
21. Black, A.T.; Hamblion, E.L.; Buttivant, H.; Anderson, S.R.; Stone, M.; Casali, N.; Drobniowski, F.; Nwoguh, F.; Marshall, B.G.; Booth, L. Tracking and responding to an outbreak of tuberculosis using MIRU-VNTR genotyping and whole genome sequencing as epidemiological tools. *J. Public Health* 2018, 40, e66–e73.
22. Ahlstrom, C.; Barkema, H.W.; Stevenson, K.; Zadoks, R.N.; Biek, R.; Kao, R.; Trewby, H.; Hauptstein, D.; Kelton, D.F.; Fecteau, G.; et al. Limitations of variable number of tandem repeat typing identified through whole genome sequencing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on a national and herd level. *BMC Genom.* 2015, 16, 161
23. Li Y, Jiao M, Liu Y, Ren Z, Li A. Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Frontiers in Medicine.* 2022;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.802719>

8. Annesso 6 - TEST DI SENSIBILITÀ

L'esecuzione del test di antibiotico sensibilità per NTM, storicamente è stata considerata di limitata utilità clinica per una serie di motivi:

- la maggioranza degli isolamenti respiratori di NTM sono clinicamente non significativi;
- per molti farmaci non esiste correlazione fra i risultati ottenuti in vitro e la risposta del paziente al trattamento o non è stato definito il breakpoint che separa le concentrazioni a cui il ceppo è sensibile da quelle a cui è resistente;
- per le specie di più frequente isolamento il trattamento si basa su protocolli terapeutici dimostratisi efficaci in vivo in studi controllati.

Secondo le indicazioni del CLSI [1,2], lo standard raccomandato per il test di sensibilità per i micobatteri non tubercolari è la microdiluizione in brodo; questa richiede una certa esperienza nonché la conoscenza dei profili di sensibilità delle diverse specie [1,2]; ne consegue che gli isolati devono sempre essere identificati accuratamente [1,2].

8.1. TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI NON TUBERCOLARI A CRESCITA LENTA

Saggio di sensibilità con il sistema Sensititre

Il metodo di microdiluizione in brodo è utilizzato da Sensititre SLOMYCO (Thermo Fisher Scientific), kit commercialmente disponibile per il test di sensibilità agli antibiotici degli NTM a lenta crescita. Il saggio è provvisto di marchio CE-IVD per uso diagnostico in vitro e permette la determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) utilizzando piastre a 96 pozzetti contenenti concentrazioni per raddoppio di vari antibiotici allo stato liofilo partendo da una sospensione batterica standardizzata. La crescita può manifestarsi come torbidità o come deposito di cellule sul fondo del pozzetto dopo 7 giorni di incubazione (fino ad un massimo di 10-14 giorni in caso di crescita non ottimale nel pozzetto di controllo). La MIC corrisponde alla concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita visibile. Fa eccezione il co-trimossazolo per il quale la MIC equivale alla concentrazione più bassa, in grado di inibire l'80% della crescita presente nel pozzetto del controllo positivo. Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore.

Esistono sufficienti dati di letteratura sulla correlazione fra i risultati del test di sensibilità in vitro e l'outcome clinico solo per *M. avium* complex (MAC) (solo macrolidi e amikacina), *M. kansasii* e *M. marinum*, limitatamente a pochissimi farmaci.

Saggio di sensibilità per *M. avium* complex

I ceppi wild type di MAC sono sensibili ai macrolidi. Per i macrolidi (claritromicina e azitromicina) è stata dimostrata, in studi clinici controllati, una correlazione tra il risultato del test di sensibilità in vitro e la risposta alla terapia. Per entrambi i farmaci la resistenza insorge a seguito di mutazioni nel gene che codifica per il rRNA 23S; il test di sensibilità deve essere eseguito solo sulla claritromicina, presentando l'azitromicina problemi di solubilità [1,2,3,4]. Il risultato è comunque valido per entrambi.

Anche l'amikacina può essere testata sui ceppi di MAC; il break-point di resistenza è ≥ 64 (32 intermedia) ma sale a ≥ 128 per i pazienti da sottoporre a trattamento con amikacina liposomiale somministrata mediante aerosol. Anche moxifloxacin e linezolid possono essere testati ma la loro efficacia terapeutica non è dimostrata [3]. Per i break-point si rimanda alla Tabella 1.

Sebbene nella pratica clinica vengano utilizzati etambutolo, rifampicina e rifabutina, i rispettivi breakpoint di sensibilità non sono stati stabiliti e non ne è consigliata la refertazione.

Per il controllo di qualità deve essere testato il ceppo *M. marinum* ATCC 927 oppure *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Saggio di sensibilità per *M. kansasii*

Dei farmaci solitamente utilizzati in terapia (rifampicina, isoniazide ed etambutolo) il test di sensibilità è raccomandato solo per la rifampicina [1,2].

Altri farmaci che possono essere testati sono, amikacina, claritromicina, doxiciclina, linezolid, minociclina, rifabutina e co-trimossazolo [1,2]. Per i break-point si rimanda alla Tabella 2.

Per il controllo di qualità deve essere testato il ceppo *M. marinum* ATCC 927 oppure *S*

Saggio di sensibilità per altri NTM a crescita lenta

I farmaci che possono essere saggiati includono: amikacina, ciprofloxacina, claritromicina, doxiciclina, linezolid, minociclina, moxifloxacina, rifampicina, rifabutina e co-trimossazolo [1,2]. Per specie a crescita particolarmente lenta come *M. xenopi* la lettura può essere effettuata dopo 10 giorni, fino 3-4 settimane, con la piastra mantenuta a 42 gradi. Per i break-point si rimanda alla Tabella 2.

Per il controllo di qualità deve essere testato il ceppo *M. marinum* ATCC 927 oppure *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

8.2. TEST DI SENSIBILITÀ PER MICOBATTERI A RAPIDA CRESCITA

Saggio di sensibilità con il sistema Sensititre

Il test in microdiluizione in brodo Sensititre RAPMYCO (Thermo Fisher Scientific) è commercialmente disponibile per il test di sensibilità degli NTM a crescita rapida ed è provvisto di marchio CE-IVD per uso diagnostico in vitro. Il sistema permette la determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) utilizzando piastre a 96 pozzetti contenenti concentrazioni per raddoppio di vari antibiotici allo stato liofilo partendo da una sospensione batterica standardizzata. La piastra viene incubata per 48 h o, in caso di crescita non ottimale nel pozzetto di controllo, per ulteriori 3 giorni. La crescita può manifestarsi come torbidità o come deposito di cellule sul fondo del pozzetto. La MIC corrisponde alla concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita visibile. Fa eccezione il co-trimossazolo per il quale la MIC equivale alla concentrazione più bassa in grado di inibire l'80% della crescita presente nel pozzetto del controllo positivo. Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore.

Per *M. abscessus* la MIC alla claritromicina deve essere letta a 14 giorni per rilevare la presenza di resistenza inducibile. *M. abscessus massiliense* presenta generalmente sensibilità alla claritromicina, a differenza di *M. abscessus abscessus* e *M. abscessus bollettii*.

Le raccomandazioni riguardanti il test di sensibilità dei micobatteri a rapida crescita sono basate su studi che hanno interessato il gruppo del *M. fortuitum* (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. boenickei* e *M. brisbanense*), *M. chelonae* e *M. abscessus*, ma possono essere applicate anche a *M. mucogenicum*, al gruppo del *M. smegmatis* (*M. smegmatis*, *M. goodii*, *M. wolinskyi*) e agli NTM a rapida crescita pigmentati clinicamente significativi.

I farmaci da testare includono amikacina, cefoxitina, claritromicina, doxiciclina, imipenem, linezolid, meropenem, minociclina, moxifloxacina e co-trimossazolo. Per i breakpoint si rimanda alla Tabella 3.

Esiste una successiva versione non marcata CE ma ad uso di ricerca in cui viene inclusa la Clofazimina.

Per il controllo di qualità deve essere testato il ceppo *M. peregrinum* ATCC 700686, oppure *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e/o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Tabella 1. Farmaci da testare per MAC con relativi breakpoint. In grigio i farmaci di seconda linea.

	S	I	R
Claritromicina	≤8	16	≥32
Amikacina (IV)	≤16	32	≥64
Amikacina (LAI)	≤64		≥128
Moxifloxacina	≤1	2	≥4
Linezolid	≤8	16	≥32

Tabella 2 – Farmaci da testare per *M. kansasii* con relativi breakpoint. In grigio i farmaci di seconda linea. Gli stessi farmaci possono essere testati (con gli stessi breakpoint) per le specie a crescita lenta diverse da MAC e *M. kansasii*; in quest'ultimo caso non ha più valore la distinzione fra molecole di prima e di seconda linea.

	S	I	R
Claritromicina	≤8	16	≥32
Rifampicina	≤1		≥2
Amikacina	≤16	32	≥64
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4
Doxiciclina	≤1	2-4	≥8
Linezolid	≤8	16	≥32
Minociclina	≤1	2-4	≥8
Moxifloxacina	≤1	2	≥4
Rifabutina	≤2		≥4
Co-trimossazolo	≤2/38		≥4/76

Tabella 3 - Farmaci testabili per *M. abscessus* e le altre specie a crescita rapida, con relativi breakpoint

	S	I	R
Claritromicina	≤2	4	≥8
Amikacina	≤16	32	≥64
Cefoxitina	≤16	32-64	≥128
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4
Doxiciclina	≤1	2-4	≥8
Linezolid	≤8	16	≥32
Imipenem	≤4	8-16	≥32
Meropenem	≤4	8-16	≥32
Moxifloxacina	≤1	2	≥4
Co-trimossazolo	≤2/38		≥4/76

BIBLIOGRAFIA 8

1. CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. 3rd ed. CLSI standard M24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
2. CLSI, Performance standard for susceptibility testing of mycobacteria, Nocardia spp., and other Aerobic Actinomycetes; approved standard 1st Ed., CLSI Supplement M62. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2018.
3. ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2016.
4. Scarparo C., Fattorini L. Test di sensibilità. In: Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo D. M., Frizzera E. Micobatteriologia Clinica. II Ed. 2013. C.E.A. Selecta