

Valutazione del sistema Bactec Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) 960 per il rilevamento di micobatteri dai materiali patologici in comparazione ai metodi radiometrico e tradizionale.

F. Fanti, S. Conti, L. Polonelli, C. Chezzi

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma

Riassunto. Sono state valutate le potenzialità diagnostiche del sistema Bactec MGIT 960 per il rilevamento di micobatteri da materiali patologici diversi dal sangue in comparazione con il sistema radiometrico basato sullo strumento Bactec 460 e il metodo culturale tradizionale su terreno Lowenstein-Jensen e Middlebrook 7H10 agar.

Il sistema MGIT 960 si basa sull'uso di tubi contenenti 7 ml di terreno 7H9 modificato e un composto sensibile al consumo di O₂ disciolto nel terreno stesso. La riduzione del livello di O₂ dovuta al metabolismo batterico determina un aumento di emissioni fluorescenti che vengono rilevate dallo strumento MGIT 960.

Lo studio è stato condotto su 480 materiali patologici (397 provenienti dal tratto respiratorio, 40 urine e 43 da altri distretti) processati con metodo NALC-NaOH secondo quanto suggerito dal Center for Disease Control (CDC) di Atlanta.

Complessivamente con i tre metodi culturali sono stati isolati 20 ceppi di micobatteri: 17 con il sistema MGIT 960 (85%), 18 con il metodo radiometrico (90%) e 10 (50%) con il metodo tradizionale su terreni solidi. I tempi medi di rilevamento sono stati di 10 giorni con MGIT 960, di 12 giorni con sistema radiometrico e di 26 giorni con i terreni solidi.

Il sistema MGIT 960 si è dimostrato rapido e sufficientemente sensibile nel rilevamento di micobatteri, inoltre tale sistema non necessita di monitoraggio invasivo nè di materiale radioattivo per il suo funzionamento.

In conclusione si può affermare che tale sistema possiede tutti i requisiti per poter essere utilmente impiegato per il rilevamento di micobatteri nei materiali patologici diversi dal sangue.

Abstract. The performance of the Bactec MGIT 960 System in comparison with the radiometric system based on Bactec 460 TB and culture method by solid media Lowenstein-Jensen and Middlebrook 7H10 was evaluated for recovery and time of detection of mycobacteria from human clinical specimens other than blood.

Bactec MGIT 960 relies on tubes filled with 7 ml of modified 7H9 broth medium containing a sensitive fluorescent sensor which, on the basis of bacterial O₂ consumption, enables fluorescence detection.

A total of 480 specimens (397 from respiratory tract, 40 urines and 43 from other districts), were prepared according to CDC NALC-NaOH method for cultural assays.

According to the culture systems adopted 20 mycobacteria isolates were detected: 17 by using the MGIT 960 system (85%), 18 by the radiometric method (90%) and 10 by the solid media (50%).

The mean time of detection was 10 days with the MGIT 960, 12 days with Bactec 460 and 26 days with solid media.

In conclusion the non radiometric Bactec MGIT 960 is a rapid, sufficiently sensitive detection system and is less labour intensive than the other. It is efficient for the recovery of mycobacteria from human clinical specimen other than blood.

Introduzione

Da oltre un decennio ormai fenomeni quali AIDS, immigrazione da paesi extracomunitari in cui l'infezione tubercolare è molto diffusa, aumento della vita

media, hanno determinato una recrudescenza dei casi di tubercolosi e di altre micobatteriosi.

La precocità della diagnosi, sia clinica sia di laboratorio, è una delle armi principali per limitare la diffusione dell'infezione da micobatteri.

Purtroppo, a causa delle caratteristiche intrinseche di molti di questi microrganismi, la diagnosi di laboratorio delle infezioni da micobatteri, se effettuata con metodi tradizionali, necessita di tempi relativamente lunghi.

Il metodo colturale radiometrico basato sul sistema Bactec 460, introdotto nei primi anni '80 consente, per la sua sensibilità, di ridurre di circa il 50% i tempi di rilevamento dei micobatteri rispetto al metodo tradizionale ed è perciò diventato, insieme a quest'ultimo, il metodo di riferimento principale.

Tuttavia l'uso di materiale radioattivo previsto per il sistema radiometrico ne rappresenta il principale limite oggettivo sia per la necessità di avere locali appositamente attrezzati sia per la pericolosità insita nella natura stessa di tale materiale in caso di rottura fortuita di un flacone.

Il sistema MGIT 960 rappresenta la prima concreta risposta alla necessità sentita da parte degli operatori del settore di superare questo limite mediante un metodo altrettanto sensibile e veloce ma che non preveda l'uso di materiale radioattivo (1-6, 8,9).

Il sistema MGIT 960 si basa sul rilevamento del consumo di ossigeno disciolto nel terreno liquido 7H9 modificato utilizzato per il saggio. Il consumo di ossigeno da parte dei microrganismi eventualmente presenti nel materiale patologico inoculato nella provetta determina un aumento di emissioni fluorescenti da parte di un composto incapsulato nel silicone posto sul fondo della provetta stessa.

Ogni flacone, prima dell'inoculo del materiale preventivamente decontaminato, viene addizionato di acido oleico, albumina, destroso e catalasi (OADC), per incentivare la crescita dei micobatteri, e di una miscela di antibiotici polimixina, acido nalidixico, trimetoprim e azlocillina (PANTA BBL MGIT) per inibire la crescita di eventuali contaminanti che fossero sopravvissuti al processo di decontaminazione. Nel sistema Bactec MGIT 960, che funge anche da incubatore, i flaconi vengono controllati ogni 60 minuti per la valutazione dell'aumento della fluorescenza.

I campioni che rimangono negativi per almeno 42 giorni (ma lo strumento può essere tarato per un massimo di 56 giorni) vengono refertati come negativi.

Materiali e metodi

Campioni utilizzati.

Lo studio è stato condotto su 480 materiali patologici di cui 397 provenienti dal tratto respiratorio (210 espettorati, 158 broncoaspirati, 19 liquidi pleurici

e 10 lavaggi broncoalveolari), 40 urine e 43 materiali provenienti da altri distretti (27 feci, 10 liquidi organici, 3 liquor e 3 materiali biotici).

Trattamento dei campioni

Prima dell'inoculo tutti i materiali non fisiologicamente sterili sono stati sottoposti a processo di decontaminazione con NALC-NaOH come suggerito dal protocollo del Center for Disease Control and Prevention (7).

I materiali provenienti da distretti sterili non sono stati sottoposti ad alcun trattamento di decontaminazione prima di essere inoculati.

Da ogni materiale sono stati allestiti preparati microscopici, colorati con metodo Ziehl-Neelsen, e colture tradizionali, radiometriche e con sistema MGIT-960.

Per l'esame colturale tradizionale il materiale patologico opportunamente trattato è stato inoculato in tubi di terreno Lowenstein-Jensen e 7H10, per quello radiometrico in terreno 7H12B (0,5 ml di materiale e 0,1 ml di miscela PANTA) e, infine, per l'esame colturale con metodo MGIT 960 ogni flacone è stato inoculato con 0,5 di materiale patologico e 0,8 ml di PANTA.

Tutte le colture sono state incubate alla temperatura di 37°C per 42 giorni.

Le colture tradizionali sono state controllate settimanalmente, quelle radiometriche sono state controllate con lo strumento Bactec 460 due volte la settimana per le prime due settimane e settimanalmente per le restanti quattro, infine le colture in MGIT 960 sono state monitorate ogni ora automaticamente dallo strumento stesso.

Risultati

Nessuna coltura risultata negativa ha evidenziato la presenza di forme alcol-acido resistenti all'indagine microscopica; quest'ultima ha evidenziato una sensibilità del 60% (12/20) fra le colture risultate positive almeno ad uno dei tre metodi adottati.

I risultati ottenuti mediante l'uso del sistema MGIT 960 sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante sistema Bactec 460 (metodo radiometrico) e mediante esame colturale tradizionale in terreni solidi Lowenstein-Jensen e 7H10 utilizzati come sistema di riferimento (Tabelle 1-3).

Come si può osservare il sistema MGIT 960 ha evidenziato la presenza di micobatteri in 17 materiali patologici, mentre con i sistemi di riferimento è sta-

to possibile rilevare micobatteri in 19 materiali patologici complessivamente. In particolare, 16 colture positive sono state rilevate sia con sistema MGIT 960 sia con Bactec 460, 2 colture si sono dimostrate positive solo con metodo radiometrico, 1 coltura, su 10 rilevate, solo con metodo tradizionale in terreni solidi (Tabelle 2-3); infine 1 coltura è risultata positiva solo mediante MGIT 960, portando a 20 il numero totale di colture positive per micobatteri considerando tutti e tre i sistemi utilizzati.

Le percentuali di sensibilità, tenendo conto del numero totale delle colture positive rilevate con i metodi di riferimento, 19, sono state dell'84,2% per il

Tabella 1. Risultati ottenuti mediante sistema MGIT 960 in comparazione ai metodi di riferimento (radiometrico e tradizionale in terreni solidi)

	ESAME COLTURALE POSITIVO	ESAME COLTURALE NEGATIVO	TOTALE
Sistema MGIT POSITIVO	16	1	17
Sistema MGIT NEGATIVO	3	460	463
TOTALE	19	461	480

Tabella 2. Risultati ottenuti mediante sistema MGIT 960 in comparazione al metodo colturale radiometrico (Bactec 460)

	ESAME COLTURALE POSITIVO	ESAME COLTURALE NEGATIVO	TOTALE
Sistema MGIT POSITIVO	16	1	17
Sistema MGIT NEGATIVO	2	461	463
TOTALE	18	462	480

Tabella 3. Risultati ottenuti mediante sistema MGIT 960 in comparazione al metodo colturale tradizionale in terreni solidi

	ESAME COLTURALE POSITIVO	ESAME COLTURALE NEGATIVO	TOTALE
Sistema MGIT POSITIVO	9	8	17
Sistema MGIT NEGATIVO	1	462	463
TOTALE	10	470	480

sistema MGIT 960, del 94,7% per il metodo radiometrico e del 52,6% per il metodo tradizionale.

Tenendo conto del numero totale di colture positive, 20, ottenute con tutti i metodi utilizzati, le percentuali di sensibilità diventano dell' 85%, 90% edel 50% rispettivamente.

I tempi medi di rilevamento per i tre sistemi considerati sono stati di 10 giorni per MGIT 960, 12 per il metodo radiometrico e 26 per il metodo tradizionale; inoltre la percentuale di colture risultate contaminate, nonostante il trattamento di decontaminazione specifico cui sono stati sottoposti i materiali patologici, sono state del 3,1% (15 colture) per il sistema MGIT 960, dell'1,2% (6 colture) per il metodo tradizionale e dello 0,6% (3 colture) per il sistema radiometrico.

Discussione

Per quanto riguarda l'esame microscopico, pur essendo il metodo più rapido d'indagine viene confermata la bassa sensibilità, che nonostante l'accuratezza dell'osservazione non va oltre il 60%.

Per quanto riguarda i risultati colturali si può supporre che il mancato evidenziamento di micobatteri in 3 materiali patologici da parte del sistema MGIT 960, 2 dei quali evidenziati dal metodo radiometrico e 1 dal metodo tradizionale su terreni solidi, sia da mettere soprattutto in relazione alla esiguità della carica microbica inizialmente presente nel materiale patologico, come dimostrato dal lungo periodo di tempo, 34 giorni, necessario per ottenere la positività delle due colture radiometriche e dall' unica colonia rilevata nella coltura tradizionale.

Il sistema MGIT 960 peraltro, ha evidenziato la presenza di micobatteri in un materiale patologico risultato negativo con i sistemi di riferimento.

Anche la percentuale di sensibilità del MGIT 960, 85%, può essere considerata buona, tenuto conto anche del fatto che, in termini assoluti, la differenza con il metodo radiometrico è risultata di una sola coltura in favore di quest'ultimo.

Il sistema MGIT 960 si è dimostrato il più rapido nel rilevamento della positività colturale con un risparmio medio di due giorni rispetto al metodo radiometrico considerato finora il più veloce.

La percentuale di colture contaminate è risultata più alta al MGIT 960 rispetto sia all'esame radiometrico sia a quello tradizionale; tale percentuale (3,1%) è comunque da considerarsi ampiamente accettabile per questo tipo di indagine e viene rilevata solo verificando il processo di decontaminazione mediante prove di sterilità.

Conclusioni

In base ai risultati ottenuti e considerando che il sistema MGIT 960 non necessita di un monitoraggio invasivo delle colture, che lo strumento funge anche da incubatore per le colture, che possono essere monitorate fino a 960 colture contemporaneamente, che i tempi medi di rilevamento sono risultati inferiori a quelli del metodo radiometrico e, soprattutto, che il sistema non prevede l'uso di materiale radioattivo, eliminando la necessità di locali appositamente attrezzati e tutta la problematica relativa, si può affermare che il sistema MGIT 960 possiede tutti i requisiti per poter essere utilmente impiegato in sostituzione del metodo radiometrico per il rilevamento dei micobatteri nei materiali patologici diversi dal sangue.

Bibliografia

1. Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, Hartley C, O'Connell MA, Hopfer RL. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2236-39, 1996.
2. Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 TB system and Lowenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Int. Tuberc. Lung Dis.* 1, 81-4, 1997.
3. Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Clinical interest of a new simple system for isolating *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Clin. Esp.* 197, 148-51, 1997.
4. Chew WK, Lasaitis RM, Schio FA, Gilbert GL. Clinical evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of *Mycobacterium* species. *J. Med. Microbiol.* 47, 821-7, 1998.
5. Cornfield DB, Beavis KG, Greene JA, Bojak M, Bondi J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the mycobacteria growth indicator tube and BACTEC 460 culture systems. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2068-71, 1997.
6. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliot LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S, Acio M, Dunbar DF, Holmes TM, Rexer CH, Savthyakumar C, Vannier AM. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 37, 748-52, 1999.
7. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga., 1985.
8. Morcillo N, Scipioni S, Vignoles M, Trovero A. Rapid diagnosis and susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics using MGIT system. *Rev. Argent. Microbiol.* 30, 155-62, 1998.
9. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, Rusch-Gerdes S. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J. Clin. Microbiol.* 35, 364-8, 1997.
10. Sion C, Degraux J, Delmee M. Early identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* using the polymerase chain reaction on samples positive by a rapid commercial culture system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 346-51, 1999.

Breve comunicazione
La sicurezza in laboratorio

M. Zavanella, G. Colosio
Brescia

Questa nota sintetica ha lo scopo di richiamare l'attenzione del personale di laboratorio sulla necessità di applicare scrupolosamente certe norme di comportamento per evitare incidenti e prevenire contaminazioni dentro e fuori dal laboratorio. L'osservanza di regole inerenti la sicurezza è imposta da una serie di direttive comunitarie, recepite in Italia nel 1994 mediante il Decreto Legislativo n. 626.

Nei laboratori diagnostici di ospedali ed enti vari gli incidenti che si registrano più frequentemente sono ustioni, ferite, intossicazioni, infezioni. Più raramente avvengono situazioni di pericolo causate da incendi, esplosioni, folgorazioni.

Nella tabella 1 si trovano schematizzati vari tipi d'infortunio, le cause, gli interventi da fare subito e le azioni di prevenzione. Sono trattate fuori tabella le infezioni acquisite in laboratorio.

Infezioni acquisite in laboratorio

Le informazioni che seguono danno l'immagine della situazione negli USA (Sewell, 2000), perfettamente sovrapponibile alla realtà europea.

L'Autore ipotizza che l'incidenza di infezioni acquisite in laboratorio dal personale di ospedali e strutture pubbliche sia compresa fra l'1 e il 5 per mille, pur non disponendo di documentazioni o di statistiche adeguate. Prima del 1980 gli incidenti erano limitati a casi di tifo, brucellosi, tubercolosi, epatite; oggi la lista degli agenti eziologici è più lunga.

Il 95% degli incidenti associati a infezioni acquisite in laboratorio è dovuto, in ordine di frequenza, a schizzi ed *aerosol* (27%), punture con aghi (25%), ferite con oggetti taglienti (16%), abrasioni cutanee (14%), pipettamento a bocca (13%).

Le principali vie d'infezione sono di seguito elencate.

<i>Via d'infezione</i>	<i>Pratica di laboratorio o incidente</i>
Ingestione	Pipettamento a bocca, spruzzi in bocca, oggetti o dita in bocca, mangiare o bere in laboratorio
Inoculazione	Punture con aghi, tagli con oggetti affilati
Pelle o mucose	Schizzi, contatto con superfici contaminate
Inalazione	<i>aerosol</i> da vortex, centrifuga, flambatura dell'ansa

Gli agenti eziologici più frequenti sono:

Brucella e *Francisella tularensis* (trasmesse via *aerosol* e non sospettate nel materiale patologico trattato in laboratorio; la loro esistenza viene scoperta a fine analisi);

Salmonella e *Shigella* (trasmesse manipolando campioni di feci; la via di contagio è comune ad altri patogeni enterici, tra cui *E. coli O157*; rari, invece, i casi da *Campylobacter* o da *Vibrio*);

M. tuberculosis (acquisito trattando i campioni clinici o durante le autopsie, favorito nella trasmissione da *aerosol* e da bassa dose minima infettante, stimata in circa 10 cellule);

Virus B e *C* dell'epatite (introdotti per ingestione toccando provette sporche di sangue);

HIV (trasmesso per lo più attraverso punture con aghi; la percentuale di probabilità di contrarre infezione è stimata intorno allo 0,3-0,5 per mille);

Funghi dimorfi (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*).

Ogni laboratorio dovrebbe preparare dei manuali di sicurezza, dopo aver individuato i propri rischi e averli catalogati in quattro categorie BSL (*Bio Safety Laboratory*), numerate da 1 a 4, come segue: