



Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.
Gruppo di lavoro Microbiologia e Virologia

N.003/23

SISTEMI PRODUTTIVI, EVOLUTIVI ED ADATTIVI IN MICROBIOLOGIA

P. Caputi (Roma), I. Campitelli (Pescara), A. Carobbio (Bergamo), F. Gentile (L'Aquila), G.A Petrilli (Campobasso)

Rev. 1.0

SITLaB news

Publicato: 04 Marzo 2023

Copyright: © SITLaB

Abstract

Introduzione: La figura del tecnico sanitario di laboratorio biomedico nei laboratori di microbiologia è di cruciale importanza non solo per la diagnostica routinaria e d'urgenza ma anche nel controllo delle infezioni correlate all'assistenza che necessitano di una tempestiva segnalazione ed intervento. Il TSLB di microbiologia mette a disposizione il suo *saper fare scientifico* per il bene del paziente con il fine ultimo di produrre un risultato affidabile, riproducibile e valido tecnicamente e clinicamente. **Obiettivo:** Lo scopo di questo lavoro è quello di far conoscere, in modo dettagliato, le attività del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, operante nel Laboratorio di Microbiologia Clinica, andando a descrivere i diversi settori in cui si può trovare a prestare la sua opera, ampliando la descrizione delle diverse tecniche applicate e delle strumentazioni utilizzate. **Materiali e metodi:** Gli strumenti utilizzati riguardano principalmente l'analisi delle tecniche utilizzate nei settori di riferimento descritti: batteriologia, micobatteriologia, virologia e parassitologia, con delle sezioni generali che descrivono le buone norme di laboratorio e di sicurezza imprescindibili per la corretta presa in carico e lavorazione dei campioni. **Risultati:** I risultati ottenuti dal nostro lavoro hanno messo in evidenza le diverse tecnologie e strumentazioni utilizzate nei laboratori di microbiologia con un excursus sui laboratori BSL3, per i quali è imprescindibile una corretta e continua formazione del tecnico sanitario di laboratorio, resa evidente dall'emergenza COVID-19 che ha rivalutato completamente il concetto ed il contesto lavorativo dei laboratori di microbiologia. Allo stesso tempo è emersa anche l'esigenza di avere personale adeguatamente formato in tutte le sezioni del laboratorio e la disponibilità di strumenti sempre più all'avanguardia per una diagnostica accurata delle malattie infettive, delle batteriemie e delle ICA. **Conclusioni:** Dal nostro elaborato è emerso che l'opera prestata dal Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico è indispensabile al fine di supportare in modo sempre più appropriato, scientifico e specialistico i bisogni di salute dei cittadini ma anche per stare al passo con le moderne tecnologie e l'automazione, ormai sempre più presenti e vincolanti nei laboratori stessi.

Parole chiavi: microbiologia, ICA, formazione, diagnostica, virologia

Introduzione

Lo scopo di questo lavoro è descrivere le attività del **Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico nel Laboratorio di Microbiologia** con il fine ultimo di valorizzare la sua opera che risulta cruciale e insostituibile nella diagnostica microbiologica di routine, con particolare riguardo all'automatizzazione e alla biologia molecolare, realtà sempre più presenti nei diversi laboratori. È bene ricordare che il laboratorio di microbiologia può riguardare non solo l'analisi di campioni provenienti da matrici biologiche ma anche l'analisi di matrici alimentari ed ambientali. Il lavoro svolto è riservato esclusivamente alla diagnostica microbiologica su campioni biologici.

Il Tecnico di Laboratorio Biomedico si occupa del corretto svolgimento di tutte le fasi analitiche, assicurando in modo

costante la **qualità** e la **riproducibilità** delle operazioni dalla fase pre-analitica alla post-analitica, al fine di rendere la performance di laboratorio vantaggiosa e sicura per il *paziente*. Decisiva è la sua attività in tutte le fasi analitiche che nel laboratorio di Microbiologia riguardano diverse sezioni: **Batteriologia, Virologia, Micobatteriologia, Parassitologia**. La diagnostica in urgenza avrà invece un lavoro a parte dedicato.

Questo lavoro non si propone di scendere nei dettagli dei protocolli in uso ma di inquadrare l'operato di un Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico nel laboratorio di microbiologia cercando di dare una visione ampia di tutte le sfumature che caratterizzano il suo operato in ambito microbiologico, spiegandone i presupposti principali, con la speranza di esser utile anche per gli studenti ed i neolaureati che abbracciano, da poco, questa professione.

Norme di sicurezza, prevenzione e comportamento

Il laboratorio di Microbiologia deve rispondere a determinate norme di sicurezza, a tutela della salute dei tecnici di laboratorio che lavorano a stretto contatto con materiale biologico potenzialmente infetto e sostanze chimiche potenzialmente tossiche.

Il personale sanitario è obbligato quindi ad osservare e rispettare precise regole dato che il rischio di contaminazione microbiologica da campioni biologici è estremamente alto; il contatto con gli agenti biologici può infatti avvenire in diversi modi: per via cutanea, attraverso le mucose, per via aerea, attraverso l'ingestione accidentale e per via parenterale. A tal proposito, il corretto utilizzo dei **Dispositivi di Protezione Individuale (DPI)** come divisa, camice, mascherine, guanti e occhiali protettivi si rivela fondamentale per la protezione del corpo, delle mani, delle vie respiratorie e degli occhi. Altrettanto importante è il corretto utilizzo – e la corretta nonché ordinaria manutenzione – dei **Dispositivi di Protezione Collettiva**: tra questi, particolare attenzione va posta alle cappe di sicurezza biologica (BSCs), progettate per proteggere l'operatore, l'ambiente di laboratorio ed il materiale di lavoro dall'esposizione a particelle di aerosol che possono generarsi durante la manipolazione di materiale biologico potenzialmente infetto. Le cappe di ultima generazione hanno in aggiunta dei filtri ad alta efficienza di filtrazione (HEPA) per la filtrazione dell'aria estratta; questo filtro trattiene efficacemente tutti gli agenti infettivi ed assicura che dalla cappa fuoriesca solo aria libera dai microrganismi. Le cappe di sicurezza, per tipo e grado di protezione, si dividono in tre classi; la classe III garantisce il più alto livello di protezione ed è utilizzata per agenti patogeni di Gruppo 4 (es. Ebola virus).

I locali devono essere inoltre dotati di porte con aperture antipanico verso l'esterno e forniti delle dotazioni di legge: sensori per fughe di gas e allarmi antincendio, estintori, docce e apparecchi per il lavaggio immediato degli occhi, disponibilità di camici, cuffie, mascherine, occhiali e guanti di protezione per tutto il personale sanitario addetto.

Gruppi di microrganismi, livelli di rischio e laboratori di biosicurezza

Secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, per le attività inerenti al laboratorio, gli agenti patogeni sono classificati in quattro gruppi di rischio (Tab.1), tenendo conto di quattro criteri specifici: **infettività, patogenicità, trasmissione e spettro d'ospite, neutralizzabilità**.

I gruppi di rischio sono così ripartiti:

- **Gruppo di rischio 1:** *nessun rischio, o basso rischio individuale e collettivo.*
- **Gruppo di rischio 2:** *moderato rischio individuale, basso rischio collettivo.*
- **Gruppo di rischio 3:** *elevato rischio individuale, basso rischio collettivo.*
- **Gruppo di rischio 4:** *elevato rischio per il singolo individuo e l'intera collettività.*

Gruppo 1	agente che presenta poche probabilità di causare malattia in soggetti umani
Gruppo 2	agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche
Gruppo 3	agente che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche
Gruppo 4	agente biologico che può provocare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori e può presentare un elevato rischio di propagazione nella comunità; non sono disponibili, di norma, efficaci misure profilattiche o terapeutiche

Tabella 1: Classificazione degli agenti biologici a seconda del rischio di infezione (D.L. 626/94)

Tenendo conto della valutazione del rischio microbiologico, dei gruppi di rischio sopramenzionati e della struttura del laboratorio, i laboratori di biosicurezza vengono divisi in quattro livelli, a seconda del tipo di agente patogeno lavorato. Sono presenti quindi quattro livelli, da BSL-1 a BSL-4, dove quest'ultimo rappresenta il laboratorio di massimo contenimento, adibito specificamente per la lavorazione di agenti patogeni di rischio 4 come Ebola virus e Lassa virus. Lecito ricordare come gli operatori autorizzati ad accedere ai laboratori di biosicurezza debbano seguire determinate procedure di vestizione, svestizione, decontaminazione e sterilizzazione del materiale, in particolare per quanto concerne il BSL-3 ed il BSL-4.

Il Decreto Legge n°626 del 19 settembre 1994 e il successivo Decreto Legislativo n°81 del 9 aprile 2008 che raccoglie le direttive riguardanti la sicurezza e i principi base per le misure di prevenzione e di protezione del rischio di infortuni nell'ambiente di lavoro, contiene nel titolo VIII le norme riguardanti il rischio di esposizione ad agenti biologici e, nel gruppo 3, classifica agenti patogeni come il *Mycobacterium tuberculosis*, che deve essere manipolato in laboratori di sicurezza BSL-3. Nell'allegato XII del TU vengono inoltre elencate le specifiche per le misure di contenimento (Tab.2).

Misure di contenimento	Specifiche
La zona di lavoro deve essere separata da qualsiasi altra attività nello stesso edificio	Raccomandato
L'aria immessa nella zona di lavoro e l'aria estratta devono essere filtrate attraverso un ultrafiltro (HEPA) o un filtro simile	Sì, sull'aria estratta
L'accesso deve essere limitato alle persone autorizzate	Obbligatorio
La zona di lavoro deve poter essere chiusa a tenuta per consentire la disinfezione	Raccomandato
Sono richieste specifiche procedure di disinfezione	Obbligatorio
La zona di lavoro deve essere mantenuta ad una pressione negativa rispetto a quella atmosferica	Raccomandato
Deve essere effettuato un controllo efficace dei vettori, ad esempio, roditori ed insetti	Obbligatorio
Superfici idrorepellenti e di facile pulitura	Sì, per il banco di lavoro, l'arredo e il pavimento
Superfici resistenti agli acidi, agli alcali, ai solventi, ai disinfettanti	Obbligatorio
Deposito sicuro per agenti biologici	Obbligatorio
La stanza deve avere una finestra di ispezione o altro dispositivo che permetta di vedere gli occupanti	Raccomandato
I laboratori devono contenere tutte le attrezzature necessarie	Raccomandato
I materiali infetti, compresi gli animali, devono essere manipolati in cabine di sicurezza, isolatori o altri adeguati contenitori	Sì, quando l'infezione è veicolata dall'aria
Inceneritori per l'eliminazione delle carcasse di animali	Sì, disponibile
Mezzi e procedure per il trattamento dei rifiuti	Obbligatorio
Trattamento delle acque reflue	Facoltativo

Tabella 2: Misure di contenimento relative al livello di biosicurezza 3 (Allegato XII)

In ogni laboratorio le procedure operative devono essere svolte secondo la cosiddetta **Buona Prassi Microbiologica**, con cui si riassume l'insieme delle tecniche finalizzate sia a promuovere la sicurezza e a ridurre i rischi sia a effettuare le analisi secondo metodi validi e protocolli standardizzati. A tal proposito, anche operando con i microrganismi di gruppo 1 è bene seguire la buona pratica microbiologica in tutte le sue parti.

Parte specialistica

Virologia e biologia molecolare in virologia

All'interno di un laboratorio di Virologia le diagnosi che vengono quotidianamente effettuate rientrano nella cosiddetta **diagnosi virologica** necessaria per contribuire alla gestione del paziente con infezione virale, non solo per arrivare ad una prima diagnosi e ad un accertamento eziologico, ma anche per monitorare la terapia di pazienti noti.

All'interno di un laboratorio ospedaliero di Virologia possiamo ritrovare diverse figure coinvolte: il medico di laboratorio specializzato in Virologia, il Biologo e il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico. Quest'ultimo si occupa **dell'indagine e della ricerca dei virus nelle matrici biologiche** che vengono inviate al laboratorio con le varie tecniche a disposizione più o meno automatizzate.

Il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico interviene nei vari step del processo a partire dalla fase preanalitica, dove la qualità del campione, la sua conservazione, il trasporto e tutte le caratteristiche richieste a seconda dell'indagine, devono essere rispettate. Le conoscenze specifiche del tecnico non si limitano ad una prima diagnosi virologica, ma sono richieste anche per il monitoraggio della terapia in pazienti noti: questo avviene sia per tenere sotto controllo la viremia, sia per indagare le eventuali cause di resistenza ai farmaci.

Diagnosi virologica: quadro generale

Il laboratorio di virologia ha come obiettivo generale quello di **individuare, quantificare e monitorare** con precisione i virus responsabili delle varie patologie ad essi correlate. Il ricorso a questo tipo di diagnosi si effettua in particolare nei donatori di sangue o di organi per la prevenzione di un'infezione, in condizioni di immunodepressione, al momento di una gravidanza, qualora sia necessario un trattamento con farmaci antivirali, per il follow-up dell'efficacia di una terapia antivirale e per il riconoscimento di un'epidemia.

I virus, infatti, sono entità biologiche semplici di dimensioni submicroscopiche con le caratteristiche di un parassita intracellulare obbligato, capaci di vivere e riprodursi solo all'interno di cellule viventi. Possiedono un solo acido nucleico (che può essere DNA o RNA) racchiuso all'interno di una struttura proteica, chiamata capsida. Questa è la struttura tipica dei virus nudi. Nel caso di virus rivestiti, invece, il capsida è circondato da uno strato di lipidi chiamato *envelope*.

All'interno di un laboratorio di virologia è possibile effettuare sia una **diagnosi indiretta** (individuazione di anticorpi diretti contro il virus e dimostrazione di una risposta immunitaria specifica e significativa, con l'ausilio di strumenti automatizzati, es. VirClia, DiaSorin TORCH) che una **diagnosi diretta** (individuazione di un componente virale). La scelta tra le due modalità dipende dal virus ricercato e dal sospetto clinico.

Tra i metodi diretti rientrano la microscopia elettronica, le colture cellulari, la rilevazione delle proteine virali e l'individuazione del genoma virale. Tra i metodi indiretti rientrano invece tutte le tecniche utilizzate nei laboratori di sierologia, basata sull'individuazione di anticorpi specifici prodotti dall'organismo infettato in risposta all'infezione virale. Negli ultimi anni, l'innovazione tecnologica e l'avvento di tecnologie molto sensibili (PCR, TMA, etc..) hanno consentito di effettuare analisi molto accurate, in sicurezza e in modo affidabile.

È infatti molto importante che siano rispettate le **condizioni di sicurezza** nel laboratorio destinate a proteggere i Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico nei confronti dei virus ricercati e ad

assicurare un costante impegno sul fronte della **qualità** per garantire l'affidabilità dei risultati analitici.

Il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, pertanto, è tenuto a conoscere e ad aggiornarsi riguardo all'innovazione delle varie tecniche, in particolare di biologia molecolare, che consentono un'analisi sempre più rapida e sensibile.

Diagnostica virologica diretta

Fase Preanalitica

Per la rilevazione degli acidi nucleici virali, i campioni biologici sono di natura molto varia e richiedono attenzioni particolari nella fase preanalitica.

La conservazione e il trasporto dei campioni biologici devono essere eseguiti in modo da **preservare la qualità** del prelievo. In alcuni casi, come per la ricerca di SARSCov2 da tampone nasofaringeo, è necessario utilizzare un materiale di trasporto specifico e se necessario un imballaggio di sicurezza per proteggere gli operatori.

La **labilità dei target** ricercati infatti richiede che la fase di preanalitica sia eseguita nel modo corretto.

Le matrici biologiche da cui è possibile effettuare la ricerca virologica sono diverse: plasma, campione bioptico, liquor cefalorachidiano, urina, sangue intero, tamponi di varia natura.

Pertanto, a seconda della tipologia di materiale, le variabilità possono essere diverse e per questo è necessario prestare attenzione affinché la qualità del campione rimanga integra. Non meno importante il fatto che i campioni devono essere adeguatamente identificati e la richiesta di esame chiaramente esplicitata.

Fase Analitica

Come anticipato in precedenza, sono diverse le tecniche di diagnosi virologica diretta esistenti. Tra queste possiamo fare un'ulteriore distinzione: **analisi qualitative**, ovvero segnalare la presenza oppure l'assenza del virus, ad esempio nel caso di SARSCov2 in cui viene semplicemente generato un referto di positività o negatività (POSITIVO-NEGATIVO/RILEVATO-NON RILEVATO), oppure **analisi quantitative**, ottenendo un valore numerico pari alla viremia, ovvero le unità internazionali per millilitro di particelle virali presenti.

Oggi, le tecniche maggiormente utilizzate riguardano **l'amplificazione tramite PCR e le sue varie applicazioni**. La ricerca, infatti, mediante l'amplificazione genica sfrutta primer complementari alla sequenza bersaglio; pertanto, si tratta di una tecnica molto specifica.

Inoltre, sei anni fa il processo era praticamente quasi tutto manuale (attraverso la realizzazione di piastre con pozzetti contenenti i vari reagenti necessari e il campione da analizzare e procedendo con il processo di amplificazione in termostato da PCR), oggi esistono strumentazioni semi o completamente automatizzate che permettono una analisi più sicura, sensibile e affidabile.

Questa automazione ha comportato molteplici **vantaggi nel processo di diagnosi**, anche se le **conoscenze maturate negli anni dal Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico** continuano ad essere richieste e ad essere ancora più specifiche, in particolare per evitare importanti contaminazioni delle macchine, dei banconi da lavoro, delle cappe utilizzate, delle micropipette e di tutto ciò che viene utilizzato durante la procedura di analisi.

Queste tecniche di biologia molecolare, come la PCR o la TMA, vengono espletate attraverso una serie di passaggi che potremmo brevemente descrivere come una prima fase riguardante

l'estrazione dell'acido nucleico virale da analizzare, attraverso la rottura delle strutture cellulari che lo contengono (lisi cellulare). Questa fase può essere effettuata attraverso buffer di lisi appositi che procedono a rompere le membrane cellulari e far fuoriuscire l'acido nucleico bersaglio. Si procede poi all'amplificazione della sequenza target attraverso l'impiego dei primer complementari alla sequenza bersaglio. Tutto ciò permette **l'amplificazione dell'acido nucleico virale** in milioni di copie e quindi la sua **identificazione e quantificazione**, se necessario.

Durante l'analisi dei vari campioni biologici è fondamentale applicare le regole di biologia molecolare, indispensabili per ottenere un risultato affidabile e corretto.

Queste tipologie di indagini sono necessarie per una prima diagnosi e per dare un nome al patogeno ricercato. Tuttavia, in un laboratorio di virologia si eseguono anche analisi necessarie a **monitorare la viremia di pazienti con infezioni virali note**, come da HIV, HBV, HCV, per verificare se la terapia sta funzionando o meno e quindi se la carica virale presente nell'organismo rimane entro certi valori. Anche per questo tipo di analisi si sfruttano tecniche di biologia molecolare che ci permettono di quantificare la viremia nel campione biologico d'interesse.

Qualora la terapia non funzionasse, è altamente probabile trovarsi di fronte a una situazione di **resistenza ai farmaci** ed è pertanto necessario introdurre un'altra tipologia di indagine, ovvero quella del **sequenziamento genico**.

In questo modo sarà possibile verificare quale mutazione presente nel gene è responsabile della resistenza alla terapia e modificare così il farmaco antivirale in uso. Queste metodiche possono essere sviluppate mediante il sequenziamento Sanger o con tecniche più innovative e recenti, quali il Next Generation Sequencing (NGS).

Regole di Biologia Molecolare

La figura del professionista Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico svolge un ruolo fondamentale all'interno del laboratorio di virologia per quanto riguarda **l'applicazione di alcune regole fondamentali di biologia molecolare**. Questo ruolo deve essere svolto con rigore per processare innumerevoli campioni biologici, anche di varia natura, **evitando contaminazioni** dei campioni stessi, degli operatori e dell'ambiente.

I Tecnici di Laboratorio di virologia, ma in generale chiunque abbia a che fare con la biologia molecolare, sono soliti applicare queste regole tutti i giorni e a causa della pandemia da SARS-CoV-2, vista la mole di campioni legata ai tamponi naso-faringei, si è capito ancora di più quanto sia fondamentale il loro scrupoloso rispetto.

La **sensibilità delle tecniche** che sfruttano la biologia molecolare amplifica la sequenza bersaglio generando trilioni di copie. Per cui potremmo avere ampliconi che, qualora il lavoro non venisse gestito nel modo corretto, potrebbero comportare delle gravi contaminazioni sia a livello strumentale e professionale.

Ecco perché è molto importante innanzitutto **suddividere l'ambiente** con stanze separate e dedicate alla pre e alla post amplificazione. Il flusso di lavoro deve partire **da un settore completamente pulito**, con guanti e camici appositi per quella stanza. Lì avremo a che fare con la preparazione della miscela di reagenti, all'interno della quale troviamo i buffer, i primers e l'enzima necessario alla reazione per eseguire la PCR. Avremo poi **una stanza dedicata ai campioni e infine quella dedicata all'amplificazione**. Il lavoro deve proseguire verso la stanza "*sporca*", ovvero verso quella in cui viene effettuata l'amplificazione.

Il flusso di lavoro non deve mai andare in senso contrario. Quando si passa dalla post amplificazione alla pre-amplificazione è necessario utilizzare guanti e camici nuovi, usare pipette e materiale di lavoro separato e pulire sempre molto bene con detergenti dedicati le superfici di lavoro. Il setting con il quale si lavora è descritto anche in direttive necessarie per l'accreditamento e la verifica di laboratori che applicano queste tecniche di biologia molecolare.

Micobatteriologia e biologia molecolare in micobatteriologia

La Tuberculosis è una malattia infettiva con obbligo di notifica, diffusa e spesso mortale causata da micobatteri, principalmente *Mycobacterium tuberculosis*. La diagnosi di malattia infettiva può essere suggerita da dati clinici derivati dall'anamnesi, esami di laboratorio generici ed esami strumentali più o meno invasivi. Tuttavia, per porre diagnosi certa, sono necessari accertamenti di laboratorio specifici volti a dimostrare la presenza dell'agente infettivo nell'organismo. Solitamente la tubercolosi interessa i polmoni (forma polmonare) ma può interessare il sistema nervoso centrale (meningite tubercolare), il sistema linfatico, l'apparato circolatorio, il tratto genito-urinario, il tratto gastro-intestinale, l'osso (le vertebre in particolare, **Morbo di Pott**), le articolazioni, la cute.

Il *M. tuberculosis complex* comprende le specie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG* e *M. africanum*. *M. tuberculosis* è l'agente eziologico della tubercolosi e di gran lunga il micobatterio di più frequente isolamento dai materiali biologici. Altre specie patogene, non facenti parte del *M. tuberculosis complex*, sono *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium ulcerans*. Tutte le specie rimanenti, sono note come micobatteri non tubercolari (MNT) e comunemente si ritrovano nell'ambiente. L'attendibilità dei risultati dipende dalle modalità con cui i campioni sono stati raccolti, trasportati e conservati: la raccolta del materiale deve essere effettuata in modo sterile, per evitare contaminazioni; in quantità adeguata e in un numero adeguato di campioni per evitare falsi negativi; utilizzando contenitori monouso sterili, con tappo a vite e senza l'uso di conservanti e fissativi. I campioni, inoltre, dovrebbero essere processati entro poche ore dall'arrivo in laboratorio. Quando non è possibile inviarli subito in laboratorio, possono essere conservati in frigorifero per non più di 48 ore. Campioni non idonei o pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere accettati. **L'escreato** è il materiale su cui più di frequente viene eseguita la ricerca di micobatteri. Poiché l'esame sia significativo è necessario che il campione non sia costituito da saliva ma provenga dalle vie respiratorie profonde; generalmente il momento più idoneo per la raccolta del materiale è al mattino poiché le secrezioni bronchiali tendono ad accumularsi durante la notte.

Colorazioni

L'esame microscopico assume, per la ricerca dei micobatteri, una rilevanza diagnostica che non trova riscontro in altri settori della batteriologia, e ciò grazie alla peculiare proprietà di tali microorganismi di essere alcool-acido resistenti. All'esame microscopico, inoltre, dovrebbe sempre essere abbinato almeno l'esame colturale. La colorazione per la ricerca di bacilli alcool-acido-resistenti (BAAR), oltre che sui campioni clinici di soggetti con sospetta infezione micobatterica, può essere eseguita su colture con presenza di crescita. È possibile effettuare la ricerca microscopica di micobatteri su qualsiasi materiale biologico. Per l'allestimento di un preparato microscopico è indispensabile usare sempre vetrini nuovi e puliti; il materiale viene strisciato su una superficie piuttosto ampia, per la concentrazione dei bacilli prima di strisciare il materiale si ricorre alla

centrifugazione. Per la ricerca dei bacilli alcol-acido-resistenti, caratterizzati da una parete batterica diversa dagli altri batteri su cui non è possibile utilizzare le comuni colorazioni, possono essere utilizzati, come coloranti primari, la carbolfucsina, colorazione di **Ziehl-Neelsen** (carbolfucsina a caldo) e di **Kinyoun** (carbolfucsina a freddo) oppure i fluorocromi, nella colorazione a fluorescenza con **Auramina – Rodamina**, i cui preparati devono essere letti al microscopio a fluorescenza. 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. Tutte le operazioni di colorazione vanno ovviamente eseguite sotto cappa chimica ma è bene ricordare che le colorazioni possono essere eseguite anche tramite l'ausilio di coloratori automatici di tipo Aerospray o ad immersione. I vetrini vengono osservati al microscopio con 100x ad immersione: i bacilli alcool-acido resistenti, nella Ziehl-Neelsen si presentano colorati in rosso su un contrasto blu in cui possono esser presenti altri batteri che hanno reagito alla decolorazione. Nell'Auramina-Rodamina, i batteri appaiono dorati su sfondo completamente nero.

Esame colturale

L'esame colturale per micobatteri presenta delle peculiarità, estranee alla batteriologia comune, legate ai tempi molto più lunghi con cui tali germi crescono sui terreni di coltura. I terreni di coltura per micobatteri, essendo tali microorganismi particolarmente esigenti, sono tutti piuttosto complessi. La coltivazione dei micobatteri è possibile solo a condizione che questi si trovino in coltura pura o che a tale condizione possano essere ricondotti artificialmente tramite decontaminazione. Molti reagenti impiegati per la decontaminazione svolgono sull'escreato anche azione fluidificante; in altre metodiche invece al decontaminante è affiancato un fluidificante. Il decontaminante ideale è una sostanza dotata di attività antibatterica su tutta la flora associata e del tutto priva di lesività nei confronti dei micobatteri. La decontaminazione può influire sulla vitalità degli stessi micobatteri, perciò è fondamentale il rispetto dei tempi di contatto tra campione e decontaminante. Il metodo più adottato utilizza come agente fluidificante N-acetil-L-cisteina (NALC) e come decontaminante idrossido di sodio (NaOH) alla concentrazione del 2%.

Le linee guida internazionali raccomandano l'uso di terreni sia solidi (ad esempio **Lowenstein-Jensen**) che liquidi per l'isolamento dei micobatteri da campioni biologici. Il sistema automatico MGIT è di gran lunga il più diffuso in Italia e nel mondo. La provetta BBL MGIT, indicatore di crescita dei Micobatteri, è una provetta contenente Brodo modificato Middlebrook 7H9 che, quando addizionato con il supplemento OADC BBL MGIT, favorisce la crescita e il rilevamento dei Micobatteri. Il terreno è contenuto in provette alle quali devono essere aggiunti un supplemento, costituito da una miscela di antibiotici (PANTA) che lo rende selettivo, e un arricchimento. Una volta inoculate con 0,5 mL di campione decontaminato le provette vengono caricate nello strumento, dove vengono incubate a una temperatura di 36 °C per 6 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 bacilli alcol-acido-resistenti. Esistono in commercio *sistemi lateral flow* (**immunocromatografici**) in grado di rilevare in pochi minuti la presenza di MTB utilizzando 100 µL di brodocoltura positiva. Il test è di facile interpretazione: se positivo compare una banda specifica oltre alla banda di controllo test.

È indispensabile giungere all'identificazione di tutti i micobatteri cresciuti in coltura, poiché tale informazione è cruciale per diagnosi e terapia. L'identificazione dei micobatteri (atipici e non)

tramite estrazione degli acidi micolici e corsa cromatografica ad alta risoluzione (HPLC) è sempre stata riservata a pochi laboratori in Italia e nel mondo. Nonostante il basso costo di una tipizzazione in HPLC rispetto a più noti sistemi di tipizzazione di biologia molecolare (Inno-Lipa Mycobacteria), la bassa diffusione di questa tecnica è dovuta sia alla mancanza di un apparecchio di cromatografia liquida dedicata, sia al fatto di dover preparare le fasi mobili e i reattivi estraenti in casa (home-made). L' "Inno-Lipa Mycobacteria" è un test di ibridazione inversa: su un supporto di nitrocellulosa sono immobilizzati oligo-probes, una miscela di primers marcati con biotina che amplificano target di DNA. L' ibridazione tra amplificato e probe è evidenziata da un segnale visibile.

Inoltre, i micobatteri presentano una sfida non indifferente per l'identificazione con MALDI-TOF MS a causa delle difficoltà nella rottura delle pareti cellulari. I protocolli, utilizzabili sia da coltura solida che liquida, prevedono una fase di inattivazione e una di estrazione delle proteine ribosomiali. Il campione inattivato ed estratto viene applicato su due spot di una piastra e cristallizzato con aggiunta della "matrice".

La piastra viene inserita nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa che genera a sua volta uno spettro di massa che viene confrontato con un "database" di spettri di specie note.

Micobatteri e farmacologia

Il bacillo tubercolare è intrinsecamente resistente alla grande maggioranza dei farmaci antibatterici di uso generale, mentre è normalmente sensibile a un ristretto numero di molecole. Il test di sensibilità dovrebbe essere eseguito su tutti i ceppi di primo isolamento utilizzando i farmaci di prima linea come etambutolo, isoniazide, pirazinamide e rifampicina. I farmaci di seconda linea dovrebbero essere testati solo in presenza di resistenze accertate a quelli di prima linea e solo in Laboratori di Riferimento. Lo Strumento BD BACTEC™ MGIT™ 960 è un incubatore e lettore in continuo delle provette MGIT di coltura e Antibiogramma dei Micobatteri. I Reagenti dell'Antibiogramma Bactec MGIT 960 comprendono gli antibiotici in forma liofila del pacchetto S.I.R.E. e della PZA. Con una stessa sospensione batterica standardizzata si inoculano una serie di provette MGIT addizionate con i singoli farmaci nonché una provetta di controllo senza antibiotico. Il rilevamento della fluorescenza e l'interpretazione dei risultati avvengono in maniera automatizzata. I risultati dell'antibiogramma, pronti nell'arco di un tempo notevolmente inferiore a quello dei metodi tradizionali possono essere visualizzati a referto. La necessità di disporre di un test rapido per la diagnosi di tubercolosi ha portato allo sviluppo delle tecniche di amplificazione mirate alla ricerca di *Mycobacterium tuberculosis complex* direttamente nei campioni clinici, sia respiratori che provenienti da altre sedi. Queste tecniche sono diventate oggi parte integrante della diagnostica microbiologica della tubercolosi.

Infine, menzione merita il sistema GeneXpert, piattaforma che sta prendendo sempre più piede nei laboratori, completamente automatizzata in cui l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione mediante emi-nested RT-PCR si realizzano all'interno di una cartuccia monouso. Il test permette il rilevamento semiquantitativo di MTC in campioni respiratori e il contemporaneo riscontro di eventuali mutazioni associate a rifampicino-resistenza. **I test di amplificazione hanno la capacità di individuare MTC direttamente nei campioni clinici in poche ore, fornendo, a condizione che vengano impiegati sulla base di un congruo sospetto clinico, risultati dotati di buona sensibilità e di eccellente specificità.** L'uso dei test di amplificazione non deve prescindere dalla contemporanea esecuzione delle metodiche tradizionali.

Regole nei Laboratori di Biosicurezza BSL3

Paragrafo a parte meritano le regole da adottare nei laboratori di biosicurezza BSL3, dove vengono lavorati patogeni di gruppo di rischio 3 come il *Mycobacterium tuberculosis* e il SARSCoV2. Fra le manovre che si eseguono comunemente in laboratorio ve ne sono alcune (centrifugazione, agitazione) che presentano un margine di rischio di formazione di aerosol assai elevato, ed è quindi proprio verso tali operazioni che devono essere dirette la maggior parte delle misure di prevenzione. L'esistenza nel laboratorio di cappe di sicurezza biologica a flusso laminare di tipo II è condizione imprescindibile per l'effettuazione di qualsiasi operazione in cui sia, anche solo potenzialmente, coinvolto il micobatterio tubercolare. Per quanto riguarda in particolare i passaggi tecnici che più degli altri possono essere definiti a rischio è bene ricordare che: la pericolosissima dispersione di bacilli che si verificava al momento della sterilizzazione alla fiamma di un'ansa contaminata ormai procedura vietata in laboratorio è stata sostituita dall'impiego di anse monouso.

Aghi e siringhe non devono essere usati come sostituti delle pipette nella manipolazione di fluidi infetti. In particolare gli aghi non devono essere reincapucciati, piegati o rimossi.

Se l'impiego di provette e contenitori a perfetta tenuta può essere sufficiente ad evitare la formazione di aerosol durante la centrifugazione o l'agitazione al vortex, solo la dislocazione dell'apparecchio all'interno di ambienti di un laboratorio di sicurezza P3 si rivela misura efficace ed indispensabile nell'eventualità di incidenti come la rottura di una provetta in centrifuga. Sulla porta del laboratorio di micobatteriologia deve essere esposto il simbolo internazionale di rischio biologico.

Un laboratorio di contenimento 3 comprende almeno un'anticamera, a pressione negativa rispetto all'ambiente esterno ed il laboratorio è a pressione negativa rispetto all'anticamera. Nel laboratorio generalmente una parte dell'aria ricircola e la rimanente viene riversata all'esterno; tutta l'aria viene comunque filtrata mediante filtri HEPA. Le porte esterna ed interna non possono mai essere aperte contemporaneamente. Gli operatori del laboratorio P3 devono indossare indumenti monouso quali camici con apertura posteriore, doppi guanti, sovrascarpe, mascherine tipo FFP2 con efficienza del 95% per particelle di 0.3 μm di diametro. Per quanto riguarda poi i disinfettanti è utile ricordare che sono efficaci nei confronti dei micobatteri: i derivati fenolici (al 5%), la formaldeide (al 5%), la glutaraldeide (al 2%) e l'ipoclorito di sodio (allo 0,5%); per tutti il tempo di contatto varia dai 15 ai 30'. Del tutto privi di attività micobattericida sono i disinfettanti a base di derivati di ammonio quaternario.

Batteriologia e biologia molecolare in batteriologia

La microbiologia è una branca della medicina di laboratorio che si occupa di diagnosi delle malattie infettive, attraverso lo studio delle varie applicazioni cliniche dei microbi, parassiti, funghi e virus al fine ultimo di migliorare la salute umana, in particolare la batteriologia si occupa dello studio dei microrganismi, detti anche batteri, sotto il profilo morfologico, chimico e funzionale.

Lo studio dei microrganismi avviene mediante la loro coltivazione in terreni di coltura specifici; attraverso l'utilizzo del microscopio, dopo colorazioni a fresco e non, è possibile osservare le cellule e la loro microstruttura.

È uno dei settori di laboratorio con maggiori difficoltà operative e di interpretazione. È indispensabile la presenza di risorse umane e personale tecnico altamente esperti, con profonda conoscenza di materiali, metodiche e protocolli e con quella capacità di "intuito" dovuto alla

conoscenza che permettono di garantire la qualità delle prestazioni nel concorrere all'elaborazione di un referto analitico o di un indirizzo terapeutico.

Il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, in un laboratorio di microbiologia, presta la sua opera attraverso l'espletamento di determinate attività:

- Si occupa della tenuta del magazzino, delle giacenze dei reattivi e provvede agli ordini in caso di previsto esaurimento dei prodotti;
- Verifica l'appropriatezza dei campioni biologici da sottoporre ad analisi registrando le eventuali non conformità e i successivi provvedimenti adottati;
- È responsabile della strumentazione a lui affidata e provvede alla manutenzione ordinaria e alla risoluzione di piccoli problemi ad essa collegati (strumenti analitici, cappe chimiche, cappe a flusso laminare, frigoriferi, termostati, incubatori, bagnomaria, autoclavi, bilance, microscopi, congelatori, vortex, Phmetro);
- Prepara campioni per esami microscopici a fresco, soprattutto per la ricerca di microrganismi difficilmente colorabili e per la ricerca diretta di parassiti e funghi;
- Esegue tecniche di semina su terreni di coltura solidi o liquidi per permettere la crescita e l'isolamento di microrganismi di interesse clinico in osservanza dei protocolli di riferimento. A tal proposito:

I terreni di coltura possono essere suddivisi in base allo stato fisico, chimico od in base alla tipologia di informazione che essi forniscono. Sulla base dello stato fisico:

- **Liquidi** ("brodi"), utilizzati soprattutto nei casi di campioni per i quali si prevede una bassa carica microbica (liquidi biologici, aspirati, etc.)
- **Solidi** ("agarizzati") in cui il brodo normale viene solidificato con agar (1.5-2%), polisaccaride acido estratto da alghe rosse tropicali del genere *Gelidium*.

Sulla base della tipologia di informazioni che forniscono, i terreni si suddividono in:

- Terreni **NON SELETTIVI**: consentono la crescita batterica di gran parte delle specie note.
- Terreni **SELETTIVI**: consentono la crescita di una (alcune) specie batteriche, inibendo la crescita delle rimanenti.
- Terreni **ELETTIVI**: favoriscono la crescita di una o alcune specie batteriche, sebbene non inibiscano la crescita di altre.
- Terreni **DIFFERENZIALI**: consentono di differenziare le specie batteriche sulla base delle loro caratteristiche biochimiche.

Alcuni terreni possono essere sia SELETTIVI che DIFFERENZIALI: privi di inibitori, consentono la crescita della maggior parte delle specie microbiche. Tra i più frequentemente impiegati ricordiamo:

- **Agar sangue**: contiene il 5% sangue montone/cavallo, evidenzia la attività emolitica: – α -emolisi e β -emolisi o γ -emolisi
- **Agar cioccolato**: contiene emoglobina (emina o fattore X), NAD (fattore V) e vitamine, per l'isolamento di germi "esigenti" dal punto di vista nutritivo. Il caratteristico color cioccolato deriva dal trattamento termico del sangue che ne causa la emolisi e, quindi, il rilascio dei fattori di crescita.
- **Brodi nutrienti**: a composizione chimica ricca, consente la crescita della maggior parte dei batteri (es. brodo di soia-caseina, infusione cuore-cervello, etc)

I terreni selettivi, consentono la crescita di particolari specie microbiche grazie alla presenza di agenti selettivi, tra cui:

- coloranti: cristalvioletto, verde brillante, fucsina basica;
- antibiotici: con attività batteriostatica/battericida vs "contaminanti";

Vengono utilizzati per l'isolamento di microrganismi patogeni presenti in campioni prelevati da siti caratterizzati da una flora microbica residente (ossia «contaminati»: cute, faringe, naso, intestino, vagina). Tra i più frequentemente utilizzati:

- Cetrimide agar;
- Thayer-Martin agar;
- MacConkey agar: contiene sali biliari e cristalvioletto, che inibiscono la crescita dei Grampositivi; selettivo per Enterobacteriaceae;
- Mannitol Salt agar: elevata concentrazione NaCl (7.5%), selettivo per stafilococchi;
- SS agar (sodio citrato, sali biliari, verde brillante): selettivo per Salmonella e Shigella spp;
- Terreni riducenti: solidi o liquidi, contengono composti chimici che si combinano chimicamente con O₂ atmosferico fino ad esaurirlo (agenti riducenti: tioglicolato di sodio, acido ascorbico, etc.). Selettivi per gli anaerobi. Contengono ingredienti in grado di differenziare particolari specie (o gruppi) microbiche sulla base della capacità di fermentare specifici carboidrati.

SEMINA DEL CAMPIONE

La semina del campione è finalizzata all'ottenimento di colonie isolate, ossia sufficientemente distinguibili, necessarie per la successiva caratterizzazione del ceppo (es. identificazione, antibiogramma). Pertanto, soltanto i terreni agarizzati possono essere utilizzati a tal fine. Il terreno da impiegare viene adeguatamente scelto sulla base della tipologia del campione prelevato e del sospetto diagnostico.

Tecnica di semina per isolamento:

1. deporre una piccola quantità di materiale patologico da esaminare al margine della piastra (se il materiale è molto denso, prima stemperarlo con soluzione fisiologica o brodo sterile).
2. mediante l'utilizzo di una spatola o di un'ansa, distribuire il materiale sulla superficie del terreno in modo da avere la formazione di colonie ravvicinate nel primo tratto di semina e colonie isolate nell'ultimo tratto.

Al fine di ulteriormente caratterizzare l'isolato (identificazione, tests antibiotico-sensibilità), una singola colonia verrà prelevata in sterilità, quindi coltivata nuovamente (sub-coltura) in adeguato terreno al fine di ottenere una coltura pura del microrganismo, ossia formata da cellule "clonali" (derivanti tutte dalla stessa cellula madre "progenitrice").

In seguito alla semina il campione dovrà essere posto ad incubare in un termostato, in condizioni ottimali di temperatura, e in presenza di O₂ per il tempo necessario alla crescita.

Dopo 24-48h si esamineranno le colonie presenti ed in base alle loro caratteristiche si potrà effettuare una diagnosi iniziale che verrà definita tramite l'utilizzo di apparecchiature automatiche che oltre all'identificazione definitiva permettono di eseguire il relativo antibiogramma.

- Effettua identificazioni sierologiche alla ricerca di antigeni e anticorpi con tecniche di immunoenzimatica (ELISA), test di agglutinazione al lattice, test con anticorpi monoclonali;
- Esegue prove preliminari di identificazione di batteri (ossidasi, catalasi...)
- Esegue test per l'identificazione dei microrganismi sia con strumenti automatici (MALDI TOF MS) sia con gallerie provviste di substrati specifici (GALLERIE API);
- Esegue test per la determinazione dell'antibiotico resistenze: antibiogrammi manuali con diffusione in agar secondo la tecnica di Kirby Bauer o utilizzando la tecnica E-Test con

l'applicazione di dischetti di antibiotici standardizzati e antibiogrammi automatici; nel caso di miceti, antimicogrammi.

- Allestisce vetrini per esami microscopici previa colorazione (colorazione di Gram, Ziehl Neelsen, inchiostro di china...)

- Si occupa di tecniche di biologia molecolare seguendo le varie fasi di estrazione, identificazione e rilevazione sia con strumenti automatici che con metodiche manuali al fine di identificare/confermare la presenza del genoma batterico in un campione biologico (PCR, LAMP PCR, Real Time PCR, Western Blot...)

Premessa basilare per ottenere un *buon risultato microbiologico* è avere a disposizione il campione da analizzare raccolto, conservato e trasportato in modo corretto; a tal riguardo saranno qui menzionati alcuni concetti già noti sulle **modalità di raccolta** dei campioni integrati da alcune indicazioni procedurali per una corretta conservazione e trasporto dei medesimi: per ogni tipo di campione che sia sangue, urina, escreato, liquor, tamponi eseguiti in varie sedi, etc, saranno indicate le procedure per la raccolta, l'invio e la conservazione.

REGOLE GENERALI:

1. Ogni campione deve essere analizzato nel più breve tempo possibile;
2. I liquidi biologici devono essere considerati tutti potenzialmente infetti;
3. Utilizzare durante le manovre che possono dare luogo ad incidenti per schizzi o contaminazione biologica, i presidi in dotazione al reparto e ai servizi;
4. Eseguire i prelievi con corrette procedure al fine di ottenere risultato attendibile;
5. Scrivere in modo corretto sia sui contenitori che sulla richiesta il nome del paziente ed il tipo di esame richiesto;
6. Contattare il microbiologo in caso di dubbio procedurale e/o di consiglio su metodica più idonea per ottenere un più rapido e valido risultato e/o per segnalare eventi al di fuori del consueto;
7. Compilare sempre ed in ogni sua parte la richiesta precisando il tipo di esame, l'eventuale antibioticotera in atto;
8. Evitare contaminazioni dei flaconi con il materiale biologico prelevato.

Il materiale su cui eseguire la ricerca del microorganismo, viene inoculato e seminato su terreni dedicati e poi incubato in termostati specifici in base alla specie che andiamo a ricercare (37°C, 25°C, con CO₂).

Nell'ultimo decennio siamo andati incontro ad un cambiamento totale del modo di lavorare in batteriologia, siamo passati dalla semina manuale al seminatore automatico che permette di migliorare le operazioni di laboratorio, migliorare l'efficienza del lavoro snellendo il flusso di lavoro e aumentando la produttività riducendo l'errore umano, migliorare la qualità dei risultati, migliorando la crescita batterica, standardizzando i tempi e le condizioni di incubazione in un ambiente automatizzato controllato.

L'identificazione dei microrganismi patogeni responsabili delle infezioni ormai avviene, nella maggior parte dei casi e nei laboratori più grandi, mediante l'utilizzo della tecnologia **MALDI TOF** (spettrometro di massa) che permette di tipizzare il microorganismo in pochi minuti con una maggiore accuratezza della tipizzazione rispetto alle vecchie metodiche, in quanto in maniera

totalmente automatizzata permette di realizzare una vera e propria “impronta digitale” del batterio/micete.

La tecnica consiste nell'assorbire la colonia d'interesse (ottenuta tramite esame colturale classico, ed isolata dopo opportuna crescita), su di una matrice, la quale all'interno del macchinario, in presenza di condizioni di vuoto, viene irradiata con un fascio laser. Il risultato è la disgregazione del campione in numerosissimi frammenti i quali vengono accelerati da un campo elettromagnetico adiacente e migrano fino a raggiungere una membrana analizzatrice. Il tempo in cui questi frammenti raggiungono la membrana (“tempo di volo”) dipenderà dalla loro grandezza molecolare. Ecco così che l'identificazione dei microrganismi avviene tramite l'ottenimento di spettri di assorbimento, i quali vengono confrontati in un database contenente quello di innumerevoli specie già note ed identificate: si realizza così un profilo proteico caratteristico per ciascun microrganismo, proprio come nella realizzazione di un identikit o meglio ancora di un'impronta digitale. L'accuratezza con cui si raggiunge il risultato finale arriva fino al 99,9%.

Perché è così importante affidarsi ad una metodica così accurata? Si è sempre detto che nei confronti di una infezione batterica, da un punto di vista strettamente clinico, ci interessa sapere più le sensibilità ai vari antibiotici che il nome e cognome del batterio coinvolto.

Sicuramente lo scopo finale dell'antibiogramma è quello di impostare una corretta terapia, e dunque maggior riguardo si avrà nella lettura delle sensibilità agli antibiotici maggiore sarà la riuscita della terapia, che riporta ad un concetto fondamentale: le interpretazioni dei breakpoints di sensibilità dipendono sempre dal genere e dalla specie del batterio isolato. È questo il motivo per cui è così cruciale assicurare un'identificazione corretta: è l'unico modo per avere un profilo di sensibilità agli antibiotici attendibile.

È doveroso ricordare che a prescindere dal MALDI TOF, esistono altre metodiche di identificazione (e antibiogramma) come il VITEK 2 e la metodica BD Phoenix, consolidate realtà in moltissimi laboratori.

In questi ultimi anni la diagnostica di laboratorio ha subito importanti cambiamenti sia di tipo tecnologico che di tipo organizzativo. Tra le cause che hanno determinato questo fenomeno una delle più importanti è sicuramente l'avvento di nuove tecniche fra le quali la **Biologia Molecolare** ha un posto di rilievo. Per biologia molecolare si fa riferimento a una serie di tecniche che consentono la rilevazione, l'analisi, la manipolazione e l'amplificazione degli acidi nucleici. A partire dalla fine degli anni 80 e l'inizio degli anni 90 queste tecniche hanno permesso di approntare nuovi test diagnostici che fino a poco tempo prima erano assolutamente impensabili. Se noi consideriamo qual è il vero utilizzo dei referti microbiologici e di quelli batteriologici in particolare, ci accorgiamo di come i nostri referti spesso servano ai clinici solo di conferma a decisioni già prese. Uno dei motivi di ciò è certamente legato ai lunghi tempi nell'esecuzione di indagini microbiologiche e in particolare di quelle batteriologiche. Nella moderna medicina la risposta deve essere la più rapida possibile. Se noi vogliamo essere parte attiva nella gestione della diagnostica delle malattie infettive e non solo banca dati dobbiamo ricercare test più rapidi che ci consentano di soddisfare le esigenze del clinico. In questo senso le tecniche di Biologia Molecolare ci possono essere di grande aiuto per la loro specificità e sensibilità ma, oggi, anche per la rapidità e la facilità di utilizzo.

La possibilità di evidenziare nell'arco di poche ore e con metodi specifici e sensibili i microrganismi che più facilmente sono responsabili di patologie infettive o sepsi con le loro farmaco resistenze, rappresenta l'inizio di un nuovo modo di operare molto più vicino a quelle che sono le esigenze dei

clinici. Ciò consentirà contemporaneamente al microbiologo clinico un approccio molto più attivo ed efficace e **favorirà la crescita della nostra disciplina.**

Oggi il Tecnico di Laboratorio Biomedico traccia un identikit completo del germe evidenziando l'effettiva patogenicità del microrganismo isolato, permettendo quindi di riconoscere il microrganismo potenzialmente responsabile delle infezioni più gravi e, conseguentemente, di impostare da subito un'azione terapeutica più incisiva.

Un valido aiuto, relativamente recente, arriva dalla diagnostica molecolare veloce per esempio con il sistema **Gene Expert** di CHEPEID, metodica alla portata anche di personale non esperto di Tecniche di Biologia Molecolare che integra e automatizza completamente le operazioni di estrazione, amplificazione e rilevazione dei campioni in un'unica cartuccia; nel giro di un'ora, compresa la preparazione dei campioni, è in grado di fornirci una risposta precisa ai nostri quesiti: infezioni respiratorie, infezioni correlate all'assistenza sanitaria e altre malattie infettive, TBC e malattie infettive emergenti. Altro sistema rapido di Biologia Molecolare è il **LIASON MDX**, un termociclatore innovativo e potente con due opzioni di dischi di consumo: il disco di amplificazione diretta a 8 pozzetti per test campione a risposta e il disco universale a 96 pozzetti per test di volume più elevato che consente di eseguire la PCR in tempo reale 90' per il rilevamento qualitativo, quantitativo e multianalitico. Il software fornisce risultati con la possibilità di controllare le curve di amplificazione dopo la corsa.

Attualmente soprattutto per la lotta alla resistenza agli antibiotici è stata introdotta un'altra metodica, il **Pheno System TM** prodotto da Accelerate Diagnostics Srl, che è in grado di offrirci un'identificazione rapida ed elaborare al contempo risultati di sensibilità agli antibiotici basati sulla MIC, direttamente dal campione di emocoltura positiva, in poche ore anziché in giorni. Al momento il focus è concentrato nel contrastare e ridurre le morti per Sepsis, così come nel ridurre drasticamente i costi di gestione del Paziente all'ingresso in Ospedale o nel reparto di provenienza, così come i costi relativi a terapie antibiotiche non appropriate (**terapia empirica**), o ancora delle complicanze in caso di sepsi in pazienti critici. L'identificazione avviene in 90' e la sensibilità agli antibiotici viene data 5 ore dopo.

La rapidità dei risultati permette al microbiologo e al clinico di individuare i batteri responsabili delle infezioni ed intraprendere 1 o 2 giorni prima una terapia salvavita (**terapia mirata**).

La **SEPSI** è una condizione grave che può comportare delle complicanze anche fatali – perciò, indirizzare rapidamente i pazienti verso una terapia mirata è fondamentale. Il **BCID2 panel** per FILMARRAY™ è l'unico saggio approvato dalla FDA, in grado di fornire la necessaria combinazione di velocità, accuratezza, facilità d'uso e completezza.

L'identificazione definitiva di un patogeno può richiedere dalle 24 alle 72 ore con i tradizionali metodi di coltura. Un ritardo che può condurre a una terapia antimicrobica inadeguata o a spettro troppo ampio e a conseguenti complicanze correlate alla terapia, a resistenza agli antibiotici e a incrementi dei tassi di morbilità e mortalità dei pazienti e dei relativi costi. I potenziali vantaggi di un test rapido e completo delle infezioni del flusso sanguigno includono, fra gli altri, una terapia antibiotica appropriata guidata, una degenza ospedaliera più breve, costi ospedalieri inferiori e tassi di morbilità e mortalità dei pazienti ridotti.

Il pannello di identificazione da emocoltura positiva (BCID2) per FILMARRAY™ è in grado di testare una gamma completa di **33 patogeni** e 10 geni di resistenza agli antibiotici associati alle infezioni del flusso sanguigno. Con un solo test è possibile identificare i patogeni in 9 emocolture positive su 10 in circa un'ora con un tempo di manipolazione di soli 2 minuti. Il BCID2 panel per FILMARRAY™ è progettato per funzionare con il sistema FILMARRAY™, un sistema di PCR

multiplex certificato FDA, CE-IVD e TGA, che integra le fasi di preparazione, amplificazione, rilevamento e analisi del campione.

L'azienda statunitense Nanosphere, Inc. ha sviluppato l'innovativo sistema Verigene[®], una workstation da banco per la diagnostica molecolare che sfrutta la tecnologia brevettata delle nanoparticelle d'oro.

Il sistema è in grado di rilevare target di acido nucleico utili per una serie di applicazioni. Sin dal principio, il sistema Verigene[®] è stato progettato tenendo come punto fermo gli utenti: questo sistema rende i test diagnostici molecolari procedure semplici, accessibili e flessibili, pur garantendo un'elevata sensibilità, precisione e un rapido rilevamento dei target multiplex richiesti da queste applicazioni. Il fattore di forza di questa tecnologia è la rapidità con il quale si riescono a ricavare i vari risultati. Cuore pulsante di ogni sistema Verigene[®] sono i due strumenti di laboratorio: Verigene[®] Reader e Verigene[®] Processor SP. Il sistema Verigene[®] utilizza consumabili da laboratorio monouso, compresa la cartuccia Verigene[®].

Esistono metodiche di identificazione che utilizzano le tecniche di ibridizzazione in situ mediante sonde fluorescenti (FISH) con tempi dalle 2 alle 6 ore.

Il sistema **autoSCAN-4** elabora i pannelli in pochi secondi, semplificando ID/AST e standardizzando i risultati.

Oltre 35 anni di provata esperienza a livello di affidabilità e tecnologia per pannelli convenzionali, con limitazioni dell'FDA minime in ID/AST automatizzati, portano a considerare autoSCAN-4 come un sistema supplementare ideale per il rilevamento di organismi difficili o come uno strumento fondamentale per bassi volumi di lavoro.

Il sistema autoSCAN-4 include il software LabPro Information Manager ed è stato progettato per semplificare il workflow e ridurre al minimo l'interazione tra i tecnici, pur essendo in grado di adattarsi ai diversi ambienti geografici e istituzionali grazie alle numerose funzioni di personalizzazione. Il software LabPro Alert_{EX} automatizza il rilevamento dei risultati atipici per generare report in modo rapido e comunicare al personale le azioni più appropriate da compiere, sulla base di procedure istituzionali personalizzate. Il funzionamento è facile da imparare e da gestire, con una formazione di base.

Anche con quantità minime di campione, la PCR consente una diagnosi e un monitoraggio affidabili delle malattie, fornendo un'elevata sensibilità che potrebbe non essere possibile con altri metodi diagnostici, come la coltura o la sierologia. L'accuratezza, la precisione e l'affidabilità della PCR sono tra le ragioni per cui è considerata il "**gold standard**" da molti nella comunità diagnostica.

Un altro materiale spesso presente in laboratorio che rientra tra le urgenze e necessita quindi di una lavorazione rapida è il liquor cefalorachidiano, inviato per effettuare una diagnosi di eventuale meningite, per cui è importante dare un risultato nel più breve tempo possibile così da salvare non solo la vita del paziente ma anche quella dei suoi potenziali contatti.

I kit eazyplex[®] CSF direct sono test qualitativi, per uso diagnostico in vitro, per la determinazione nel liquor di agenti infettivi (batteri e virus) che possono causare infiammazioni del sistema nervoso centrale.

Questo sistema si basa su una reazione di amplificazione isoterma basata sulla tecnologia **LAMP**, eseguita con reattivi pronti all'uso e liofilizzati, che possono essere utilizzati direttamente a temperatura ambiente senza la preparazione di alcuna reazione ulteriore o buffer. Il sistema eazyplex[®] **non necessita di estrazione del DNA/RNA**. Una semplice fase di bollitura di 3 minuti prepara il campione per l'analisi.

I prodotti di amplificazione vengono generati da una reazione isotermica della durata di 30 minuti, il cui risultato è visualizzabile in tempo reale sul display dello strumento. L'interpretazione dei dati viene eseguita automaticamente dal software eazyReport™.

Parassitologia e biologia molecolare in parassitologia

Nel vasto insieme di tutte le sezioni afferenti al Laboratorio di Microbiologia, per ultima ma non meno importante, si riporta la sezione di Parassitologia.

Le tecniche in uso nei laboratori di Parassitologia mirano ad evidenziare l'agente eziologico causa di parassitosi: si parla di **ectoparassiti**, in particolare gli artropodi, con riguardo ad aracnidi (acari, zecche) ed insetti (pidocchi, pulci, cimici, triatomi, ditteri ematofagi) e di **endoparassiti**, suddivisi in tre grandi sezioni a loro volta divise in altre sottoclassi: 1) **protozoi**, in cui rientrano le amebe, i flagellati, gli sporozoi, i ciliati; 2) **platelminti**, di cui fanno parte i ciclofillidei, gli pseudofillidei ed i digenei; 3) **nematelminti**, grande gruppo comprendente i nematodi.

I parassiti sono causa di malattie molto variabili, che possono riguardare tutti i distretti dell'organismo.

Inoltre, alcuni sono agenti eziologici di parassitosi diffuse in tutto il mondo a cui l'Organizzazione Mondiale della Sanità porge da anni attenzione ed energie, come la malaria, le tripanosomiasi americana e africana, la leishmaniosi e la filariosi, che nel mondo colpiscono milioni di persone con effetti estremamente invalidanti in particolare nei paesi a basso reddito, dove la diagnostica microbiologica ed il personale formato per quanto sia fondamentale, è purtroppo carente. Per affrontare questo problema è necessario pensare ad una grande pianificazione che trova riscontro nell'*Health Technology Assessment*, un metodo per l'analisi delle implicazioni medico cliniche, sociali, organizzative ed economiche di una tecnologia sanitaria attraverso una **valutazione multiparametrica** che considera esigenze cliniche, efficacia, costi, impatto organizzativo e sociale.

La formazione del personale di laboratorio addetto alla sezione di Parassitologia, che deve essere mantenuta costante nel tempo, è un punto basilare per la diagnosi di parassitosi.

La diagnosi può essere: **diretta ed indiretta** per protozoi ed elminti attraverso tecniche morfometriche (cisti e/o uova), immunologiche e molecolari e **diretta (Fig.1)** per artropodi ed altri ectoparassiti; i campioni che possono pervenire in laboratorio riguardano qualsiasi distretto dell'organismo: cute, sottocute, mucose, tessuto muscolare (biopsie), cavo orale, canale gastroenterico, vie biliari, fegato e milza, apparato genito-urinario, occhio, SNC, midollo osseo, sangue, vie linfatiche, liquor, a seconda del tropismo che un determinato parassita possiede (es. *Plasmodium falciparum* → sangue, *Leishmania tropica* → raschiato cutaneo, *Onchocerca volvulus* → campioni provenienti da cute e occhio, *Giardia intestinalis* → feci, *Enterobius vermicularis* → scotch test, *Trypanosoma brucei rhodesiense* → sangue, aspirato midollare, liquor, etc).

Le tecniche di laboratorio utilizzate in parassitologia si basano su diversi principi:

- Identificazione **macroscopica** del parassita (quando possibile, su ecto/endoparassiti; es. agenti di miasi, larve di elminti, proglottidi di tenia nelle feci, visibili già ad occhio nudo nell'esame coproparassitologico) e **microscopica** (endoparassiti, es. goccia spessa e striscio sottile per *Plasmodium spp.*, esame delle feci post concentrazione con la Tecnica di Ridley per trofozoiti e/o cisti di parassiti intestinali); Nell'esame macroscopico delle feci, le feci acquose o diarroiche devono essere esaminate per prime; inoltre, l'eventuale presenza di sangue e/o muco sono due elementi spia di possibili parassitosi intestinali gravi. La consistenza ci dà un valido aiuto sullo

stadio biologico del parassita; infatti in caso di feci composte è più plausibile il rinvenimento di cisti all'esame microscopico, in caso di feci diarroiche o liquide, troveremo invece trofozoiti.

- Rilevamento/identificazione **molecolare** di protozoi ed elminti al fine di rilevare basse cariche parassitarie e soprattutto per identificare specie gemelle (es. *Entamoeba histolytica* ≠ *Entamoeba moshkovskii*), larve di elminti non diagnosticabili microscopicamente), *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, utilizzando la Real Time PCR che consente la rapida rilevazione anche di patogeni difficilmente coltivabili o in caso di bassa carica parassitaria;
- Diagnosi **immunologica** e diagnosi **sierologica** (ELISA, ICT, immunofluorescenza diretta ed indiretta per la ricerca di antigeni, ricerca di anticorpi per parassitosi tessutali e/o per tutte quelle parassitosi per le quali non esistono altri kit in commercio, in ICT, ELISA);
- Controllo delle infezioni protozoarie da trasfusioni e trapianti (tripanosomi, plasmodi, toxoplasma, leishmanie);
- Monitoraggio delle infezioni protozoarie congenite (con riguardo a *Toxoplasma gondii*) ed in pazienti immunodepressi (es. HIV).

È bene sottolineare, come accennato in precedenza, quanto sia importante l'aggiornamento del personale specializzato in parassitologia, data la possibilità di individuare casi di parassitosi non autoctone ma importate e agenti di zoonosi.

In Italia, ad esempio, furono segnalati casi di *Trichostrongylus* e *Fasciola hepatica*, solitamente non presenti nel nostro paese: a tal proposito sono necessari continui corsi di aggiornamento al fine di essere al passo per la diagnosi di eventuali parassitosi emergenti e riemergenti.

Alla luce di quanto descritto, anche per la diagnosi parassitologica, la biologia molecolare compreso il sequenziamento del DNA ha avuto un ruolo cruciale nell'avanzamento tecnologico, consentendo di avere una enorme quantità di dati riguardanti moltissimi agenti infettivi. La Real Time PCR sta divenendo sempre più importante grazie alla capacità di generare risultati qualitativi e quantitativi valutando la reale carica parassitaria, appunto, in tempo reale. Altra tecnica molecolare innovativa che sta prendendo sempre più piede nei laboratori è la LAMP basata su una reazione di amplificazione isoterma che permette di discriminare tra sequenze di DNA con una differenza di un singolo nucleotide. La LAMP è utilizzata anche per discriminare la presenza di zanzare infette da *Plasmodium* e *Dirofilaria immitis* risultando un valido aiuto anche negli screening epidemiologici che permettono un costante e attento monitoraggio dei flussi di eventuali vettori infetti. Spesso, la PCR può essere seguita dalla nested PCR o da trattamento con enzimi di restrizione.

Tabella 41.2 Principali vantaggi dei metodi di rilevamento diretto	
Osservazione macroscopica	<ul style="list-style-type: none">• Consente il rapido rilevamento di elminti e artropodi senza alcuna attrezzatura
Microscopia	<ul style="list-style-type: none">• Ha numerosissime indicazioni (tutti gli endo- ed ectoparassiti che si possono incontrare nelle comuni diagnosi di laboratorio)• È l'unico metodo che permette il rilevamento simultaneo di tutti i parassiti presenti, la valutazione della carica parassitaria di ogni specie, l'identificazione di tutti i parassiti• Ha costi assai modesti (materiali e attrezzature non dispendiosi)• È alla portata di tutti i laboratori
Ricerca di antigeni	<ul style="list-style-type: none">• Non è necessario rispettare i ritmi biologici dei parassiti per il prelievo• Se rileva antigeni metabolici, è applicabile nella diagnosi di infezioni "occulte"• Spesso permette di porre la diagnosi precoce di un'infezione e talora di differenziare un'infezione in atto da una pregressa
Ricerca di DNA/RNA	<ul style="list-style-type: none">• Ha elevata sensibilità (come una potentissima tecnica di concentrazione o una coltura, ma, a differenza di quest'ultima, è applicabile a tutti i parassiti)• È caratterizzata da specificità e riproducibilità• Identifica parassiti in qualunque stadio (anche larvale)• Discerne tra specie gemelle (v. Fig. 41.5)• Utile (come la microscopia) nel paziente con deficit immunitari

Conclusioni: Il valore dell'opera del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico

Alla luce di questo elaborato, è facile comprendere quanto sia imprescindibile la figura del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico nei laboratori – nel nostro caso nel laboratorio di Microbiologia e Virologia – e soprattutto quanto sia elevato il valore della sua opera soggetta ad un continuo aggiornamento scientifico. L'evoluzione del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (*Il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico 2.0, Stanziale S. et al;*) è necessaria al fine di supportare in modo sempre più approfondito e specialistico i bisogni attuali di salute dei cittadini ma anche per stare al passo con le moderne tecnologie e l'automatizzazione, ormai sempre più presente, nei laboratori stessi.

I laboratori di Microbiologia e Virologia, in particolare con l'emergenza sanitaria da SARSCoV-2, hanno contribuito ad evidenziare l'importante contributo professionale e scientifico, fornito dai Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico, che ha permesso di perseguire risultati attendibili e riproducibili in tempi stretti e di realizzare un servizio *fast lab* in stretta relazione con il personale clinico. Nell'emergenza COVID19 – ma non solo - la corretta e rapida diagnosi virologica ha un valore insostituibile nella medicina ospedaliera e nella sanità pubblica, contribuendo sia all'isolamento e notifica di casi positivi al SARSCoV-2 sia all'orientamento della terapia antibiotica/antivirale, permettendone la sua rivalutazione nel tempo. Ruolo cruciale dei laboratori di Microbiologia è anche quello di diagnosticare e controllare le infezioni correlate all'assistenza (ICA).

È utile, a tale proposito, sottolineare che la sorveglianza delle ICA si avvale principalmente del laboratorio, e pertanto si può sostenere, a ragione, che il laboratorio di microbiologia costituisce la spina dorsale nel controllo delle infezioni, rappresentando un osservatorio privilegiato attraverso il quale, le figure dedicate al management delle infezioni possono seguire la continua evoluzione delle malattie infettive, segnalare la comparsa di nuovi patogeni, fornire documentazione sulla distribuzione dei microrganismi isolati e sui profili di sensibilità agli antibiotici per i patogeni di più frequente riscontro, monitorare l'insorgenza di resistenze batteriche e svolgere al contempo un'azione di educazione e controllo sull'uso improprio di antibiotici o sulla mancata osservanza di linee guida.

Il costante e notevole aggiornamento tecnologico, dei software e delle strumentazioni di laboratorio, rende quindi inevitabile il continuo aggiornamento dei Tecnici Sanitari di Laboratorio Biomedico, al fine di garantire la tracciabilità, la standardizzazione e la massima qualità di tutte le fasi del processo lavorativo che sono gli elementi cardine della sanità moderna che vive in simbiosi con l'innovazione tecnologica.

Il "sapere scientifico" del Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico, che si nutre non solo della sua meticolosa e preziosa opera quotidiana ma anche dell'offerta formativa ulteriore al corso di Laurea Triennale, rappresentata dalla Laurea Magistrale (*ad oggi l'unico corso riconosciuto per i Tecnici di Laboratorio Biomedico è la LM in Scienze Tecniche Diagnostiche, ad orientamento principalmente manageriale*) e dai diversi Master attivati nelle varie sedi universitarie, e delle pubblicazioni scientifiche sempre più frequenti, contribuisce, e continuerà a contribuire in futuro, a rendere sempre più questo professionista colonna portante di tutti i laboratori, in linea con l'evoluzione, delle conoscenze scientifiche, dei bisogni sanitari, della ricerca scientifica e dello sviluppo tecnologico.



Bibliografia e Sitografia

1. **Kenneth J. Ryan, C. George Ray.** *Sherris, Microbiologia Medica.* The McGraw Hill Companies, 2017. Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali.
2. **Antonelli G., Clementi M.** *Principi di Virologia Medica.* Casa Editrice Ambrosiana, 2018.
3. **Borgia G., Gentile I., Battista G., Coppola N.** *Malattie infettive e tropicali.* Idelson-Gnocchi, 2020.
4. **Vullo V., Moroni M., Mastroianni C., Antinori S.** *Manuale di Malattie Infettive.* Edizioni Edra, 2020.
5. **Cancrini G.** *Parassitologia Medica Illustrata.* Edra, 2019.
6. **Cancrini G.** *Parassitologia e tecniche di laboratorio.* Lombardo, 2013.
7. **Murdolo M.** *Microbiologia e Parassitologia.* Universitalia, 2012.
8. **Fanti F.**, *Laboratorio di Microbiologia, Biochimica, Igiene e Patologia.* Zanichelli, 2019.
9. **AIRESPSA., ISPEL;** *Manuale di Sicurezza nei Laboratori.* Edizione in lingua italiana. Terza edizione.
10. <http://www.amcli.it/>
11. http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2020/06/PARASSITOSI-EMATICHE-PERCORSO-DIAGNOSTICO-DEFINITIVO-12_06_2020.pdf
12. Linee Guida Operative per la diagnosi delle Parassitosi Intestinali, *Comitato di Studio per la Parassitologia dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani.*
13. **W. Ricciardi, G. La Torre.** *Health Technology Assessment: principi, dimensioni e strumenti.* Edizioni SEEd, 2010.
14. **Health Equality Europe.** *Comprendere l'Health Technology Assessment (HTA)*
15. Tortoli E., Simonetti Tullia M. *I micobatteri. Laboratorio di Batteriologia e Virologia.* – Firenze, Medical System.
16. **Scarpato C., Riva R.** *La sicurezza nel laboratorio di micobatteriologia.* In: Tortoli E., Piersimoni C., Scarpato C., Cirillo D. M., Frizzera E. *Micobatteriologia Clinica.* C.E.A. Selecta Medica, Pavia. I Ed. 2013.
17. ECDC Biosafety in the laboratory diagnosis of tuberculosis. In: Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, 2016.
18. TB respiratory protection program in health care facilities, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 1999, <http://www.cdc.gov/niosh/99-143.html>, e Guidelines for prevention of tuberculosis in health care Facilities in resource-limited settings, WHO/TB/99.269).
19. **Koch R.:** Further communication on a remedy for tuberculosis. Dtsch. Med
20. ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2016.
21. **Tortoli E., Piersimoni C., Scarpato C., Cirillo D. M., Frizzera E.** *Micobatteriologia Clinica.* II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia.
22. **Migliori G.B., Sotgiu G., Rosales-Klintz S., et al.** *European Union Standards for Tuberculosis care.* 2017 update. Eur Respir J. in press, 2017.
23. **Tortoli E.:** Micobatteri. (1981), 380-408. In: Pasquinelli F.: *Diagnostica e tecniche di laboratorio.* Rosini Ed. Firenze.
24. **Molinari G.L.** Esame microscopico In: Tortoli E., Piersimoni C., Scarpato C., Cirillo D. M., Frizzera E. *Micobatteriologia Clinica.* II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia
25. CLSI, Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline, 2008, CLSI, Wayne, PA.
26. BD Diagnostic Systems. BACTEC 460TB System Product and Procedure Manual
27. **Tortoli E.** Identificazione dei micobatteri. In: Tortoli E., Piersimoni C., Scarpato C., Cirillo D. M., Frizzera E. *Micobatteriologia Clinica.* II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia
28. **Stanziale S., Palumbieri V., Magaldi A., Di Stefano S., Bianculli A.,** *Il Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico 2.0 – Associazione Tecnico Scientifica S.I.T.L.a.B,* 2019.
29. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M., Chadwick M., Siddiqi S., *Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of M. tuberculosis to classical second-line drugs and newer antimicrobials,* 2006, J Clin Microbiology.
30. CDC, Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis, 2009, MMWR; 58:7-10.