

La revisione degli standard organizzativi della diagnostica delle micobatteriosi presso il Laboratorio dell'Ospedale di Rovereto

P. Gualdi, R. Maffei, M. Schinella

Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale di Rovereto (TN)

Riassunto

Premessa. Nella diagnostica delle micobatteriosi è necessario e obbligatorio che i laboratori assicurino prestazioni opportune in termini di qualità e di sicurezza, adeguando le strutture, le attrezzature e le condizioni di lavoro. Lo scopo di questo lavoro è quello di documentare il percorso compiuto dal Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia dell'Ospedale di Rovereto, per ottimizzare la diagnostica dei micobatteri nel periodo dal gennaio 1996 al dicembre 2004, alla luce degli obblighi previsti dal Decreto Legislativo n° 626 del 19.09.94 riguardante a) il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori nel luogo di lavoro; b) della necessità del rispetto delle linee guida per quanto riguarda la diagnostica; c) dell'aderenza agli standard previsti dal processo di accreditamento/certificazione.

Metodi. Sono stati analizzati i campioni provenienti sia da pazienti ospedalizzati che da pazienti ambulatoriali nel periodo 1996-2004. Delle varie fasi lavorative della diagnostica micobatteriológica sono state prese in considerazione: fase preanalitica, fluidificazione e decontaminazione, esame microscopico, esame colturale. Di ciascuna fase è stato descritto il flusso operativo e le modifiche fatte nel corso degli ultimi otto anni

Risultati. Fase preanalitica: sono state definite linee operative scritte riguardanti la raccolta, la conservazione, il trasporto e l'accettazione dei campioni. Fluidificazione e decontaminazione: vengono riportate le percentuali di contaminazione dei campioni e le misure correttive per mantenere sotto controllo il fenomeno, sia nella fase operativa (prefluidificazione del campione con agente mucolitico, utilizzo di NaOH più concentrato, controllo dei tempi) che nell'utilizzo della cabina a flusso laminare (programma di manutenzione e/o sostituzione filtri). Esame microscopico: l'esame di preparati

microscopici a partire da sedimenti ottenuti dopo fluidificazione-decontaminazione e colorati con fluorocromi (auramina-rodamina) ha portato ad una maggiore sensibilità, ad una riduzione dei tempi di risposta (entro 24 ore lavorative), nonché ad una maggior sicurezza per l'operatore dovuta all'utilizzo della capsula chimica per il processo di colorazione. Esame colturale: nel periodo considerato, sono stati esaminati 8.822 campioni, da cui sono stati isolati 152 micobatteri (1,7% dei totali); tra questi 106 (69%) sono Micobatteri Tubercolari (MTC) e 46 (31%) sono Micobatteri non tubercolari (MNT); la percentuale dei campioni positivi non rappresenta la reale incidenza e tanto meno l'effettivo numero dei campioni positivi, perché nel caso di un paziente con più campioni, risulta un solo isolato tipizzato. Dei 152 campioni positivi per micobatteri, 31 sono stati rilevati con il MGIT manuale, 51 con il BACTEC 9000F/MB e 70 con l'attuale MGIT960, mentre il terreno solido (Lowenstein-Jensen) ha rilevato una positività in soli 103 campioni. I tempi medi di rilevazione per il terreno liquido sono rispettivamente: 19 gg. per il MGIT manuale (con un intervallo di tempo tra 3 e 42 gg.), 18 gg. per il BACTEC 9000F/MB (con un intervallo tra 6 e 40 gg.) e 15 gg. per il MGIT960 (con un intervallo tra 6 e 35 gg.). Sicurezza: sono descritti i cambiamenti operativi più importanti attuati nel periodo 96-2004 che hanno interessato le varie fasi lavorative e i cambiamenti strutturali, fino ad ottenere un'area dedicata a tale diagnostica conforme ai requisiti richiesti.

Conclusioni. Questo percorso ha portato il Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale di Rovereto a raggiungere i requisiti operativi, organizzativi e strutturali indispensabili per effettuare la diagnostica delle micobatteriosi e ha fatto acquisire agli operatori la consapevolezza di lavorare secondo le linee guida e nel rispetto delle norme di sicurezza.

Summary

Revision of the operating procedures concerning the diagnosis of Mycobacteria infection in the laboratory of the Hospital of Rovereto

Background. To assess the diagnosis of mycobacterial infection, for laboratories it is necessary and compulsory to assure appropriate procedures in terms of quality and safety, adapting facilities and working conditions.

The aim of the present work was to show the improvement which has been completed in the laboratory of Rovereto from January '96 to December '04. This assessment was to optimise the diagnostic procedures of mycobacterial disease and to obtain a) accordance to law n° 626 (9/19/94) concerning the improvement of safety and health in the working environment; b) accordance to diagnostic guide-lines; c) compliance to standards included in accreditation/certification procedures.

Methods. Samples belonging to either hospitalised or outpatients were analysed during the above mentioned times. Different diagnostic steps were considered: pre analytical phase, fluidification and decontamination, microscopy and culture. The operative flow and its modifications in the course of the last 8 years were described.

Results. Pre analytical phase: written guide lines concerning sample collection, transport and acceptance, were defined. Fluidification and decontamination: percentage of contaminated samples and corrective decisions were reported concerning either the preoperative phase (sample prefluidification, more elevated NaOH concentration, time control) or laminar flow box utilisation (filter utilisation and replacement).

Microscopy: samples examination obtained following fluidification/decontamination and fluorochrome stained smears, achieved the sensitivity, reduced the time reporting (24 hours) and increased the operators' safety by using a staining box.

Cultures: during the above mentioned time interval 8822 samples were processed. In 152 (1,7%) mycobacteria were detected of which 106 (69%) were defined as positive for *M. tuberculosis* (MT) while 46 (31%) were defined as *M. other than tuberculosis* (MOTT). The percentage of positive samples is not corresponding neither to the real incidence nor to the number of positive samples (only one of the samples belonging to a patient was defined).

Of 152 positive samples, 31 were detected by using manual MGIT, 51 by using BACTEC 9000F/MB, 70 with MIGIT 960, while in solid culture (Lowenstein-Jensen) only 103 samples were detected. Mean detection times for liquid medium were 19 days (3-42) for manual MGIT, 18 days (6-40) for BACTEC 9000F/MB and 15 days (6-35) for MGIT960 respectively.

Safety: more relevant changes in operating procedures were described. The changes led to set a specific diagnostic area corresponding to law requirements.

Conclusions. Changing in operating procedure allowed the laboratory of our hospital to reach a new organisation and to obtain structural requirements. Furthermore the staff reached the awareness of operating in the respect of guide-lines and safety recommendations.

Key words: MTC, MNT, diagnostic procedures, improvement.

Introduzione

Con l'avvento di tecniche biochimiche e molecolari per la coltura e l'identificazione, sono state descritte circa 100 specie di micobatteri divise in *M. tuberculosis complex* e *M. non tubercolari* (NTM)¹.

Il Center for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta ha emanato delle raccomandazioni sulla diagnostica delle infezioni da micobatteri che prevedono tra l'altro l'utilizzo di una colorazione con fluorocromi, l'esecuzione sui campioni clinici di un esame colturale sia in terreno solido che in terreno liquido, l'utilizzo dei controlli di qualità di cui devono essere registrati i risultati e la revisione delle attrezzature e procedure di laboratorio necessarie a garantire un alto grado di sicurezza².

In accordo con le raccomandazioni della letteratura internazionale, nei Paesi industrializzati l'organizzazione dei laboratori di micobatteriologica è articolata su 3 livelli con compiti e requisiti diversi a secondo dell'attività svolta³.

In questo lavoro viene documentato il percorso compiuto dal laboratorio di Rovereto nel periodo dal gennaio 1996 a dicembre 2004 alla luce: a) degli obblighi previsti dal Decreto Legislativo n° 626 del 19.9.1994; b) della necessità del rispetto delle linee guida per quanto riguarda la diagnostica; c) dell'aderenza agli standard previsti dal processo di accreditamento/certificazione.

Per quanto riguarda l'ultimo punto, nel febbraio 2003 è stata pubblicata la norma ISO 15189, documento che for-

nisce le linee guida per la gestione e lo sviluppo del sistema qualità dei laboratori di analisi, che rispetto alle vecchie ISO mettono in risalto anche gli obiettivi per la qualità che il laboratorio deve perseguire per soddisfare le esigenze degli utenti.

Metodi

Fluidificazione e decontaminazione

In passato i campioni clinici, specie i respiratori, venivano trattati direttamente con la soluzione di lavoro. In seguito sono stati sottoposti preliminarmente ad un processo di fluidificazione aggiungendo una pari quantità di agente mucolitico (Sputasol), lasciandolo agire per almeno 30 minuti. I campioni di urine o di liquidi cavitari quali pleurico, ascitico, sinoviale (se in quantità superiore a 10 ml) vengono preventivamente concentrati, mediante centrifugazione a 3.600 giri per 15 minuti, utilizzando provettoni da 50 ml in plastica con tappo a vite e procedendo quindi nelle successive fasi analitiche con il sedimento ottenuto. La fase di fluidificazione/decontaminazione vera e propria consiste nell'aggiunta al campione di una uguale quantità di soluzione di lavoro costituita da N-acetil-L-cisteina (NALC)/idrato di sodio/citrato di sodio. Si lascia agire per 15 minuti, quindi si aggiunge una quantità di tampone fosfato fino a 50 ml (per bloccare l'azione del decontaminante) e si ricentrifuga a 3.600 giri per 15 minuti. La soluzione di lavoro è formata da parti uguali di soluzione ac-

quosa 0,1 M di citrato di sodio e di soluzione acquosa 4% di idrato di sodio con aggiunta al momento dell'utilizzo di NALC. I singoli componenti sono forniti dalla Farmacia dell'ospedale.

Per controllare la capacità decontaminante della soluzione è necessario inoculare giornalmente alcuni campioni trattati sia sui terreni per micobatteri che su agar sangue, dove solo rarissime colonie dovrebbero crescere dopo 24-48h di incubazione a 37°C. È necessario registrare la percentuale dei campioni clinici contaminati. Sono considerate accettabili percentuali comprese fra il 3 e il 5% (3,4). In base a tali dati, infatti, per un periodo (inizio 2001) si è utilizzato NaOH più concentrato, per poi ritornare, anche per adeguarsi alle linee guida, ad usare NaOH al 4%.

Esame microscopico

L'allestimento del vetrino per l'esame microscopico avveniva fino al 2000, prima di sottoporre il campione al processo di fluidificazione-decontaminazione. In seguito si è adottato il sistema di preparazione del vetrino dopo il trattamento, cioè prima dell'inoculo nei terreni specifici.

Per quanto riguarda la colorazione, all'inizio del periodo in esame, veniva usata la Ziehl-Neelsen che prevede la colorazione del vetrino con carbolfucsina di Ziehl, scaldandolo da sotto con la fiamma del Bunsen, fino alla formazione dei primi vapori. Fa seguito una decolorazione con acido solforico al 20% e alcool etilico ed infine la colorazione di contrasto con blu di metilene. Questa colorazione veniva però effettuata in una stanza non dedicata alla diagnostica micobatterologica priva di cappa chimica.

Problemi di sicurezza hanno portato successivamente ad utilizzare la colorazione di Kinyoun, che prevede la carbolfucsina senza fase di riscaldamento. La scarsa sensibilità di tale colorazione ci ha orientati verso l'auramina-rodamina con lettura in fluorescenza. Questa prevede la colorazione del vetrino con auramina-rodamina, la decolorazione e la colorazione di contrasto con permanganato di potassio.

Oggi quindi si utilizza come colorazione di screening l'auramina-rodamina, che è più sensibile e come colorazione di conferma la Ziehl-Neelsen che è più specifica^{3,5}.

I vetrini colorati vengono osservati al microscopio ottico con l'obiettivo 100x nel caso della Ziehl-Neelsen o al microscopio a fluorescenza con l'obiettivo 20x nel caso dell'auramina-rodamina. I campioni che risultano positivi all'esame microscopico vengono registrati e i vetrini conservati nei porta-vetrini dedicati. Le colorazioni vengono effettuate nella stanza di micobatterologia dove è presente una cappa chimica. L'esame di preparati microscopici a partire da sedimenti ottenuti dopo fluidificazione-decontaminazione e colorati con fluorocromi (auramina-rodamina) ha portato ad una maggiore sensibilità e ad una riduzione dei tempi di risposta (entro 24 ore lavorative), in accordo con le indicazioni riportate dalle linee guida^{3,10}.

Per l'esame microscopico viene effettuato un controllo di qualità interno (C.Q.I.), includendo ad ogni colorazione un vetrino di controllo positivo e negativo. Il nostro laboratorio esegue anche un controllo di qualità esterno (NEQAS: National External Quality Assessment Service for Microbiology) che prevede la colorazione e la lettura di vetrini preparati.

Esame colturale

Il campione dopo la fase di fluidificazione, decontaminazione e concentrazione, viene seminato su due terreni di coltura specifici di cui uno liquido ed uno solido (Lowenstein – Jensen, L.J.).

L'introduzione di un terreno di coltura liquido associato al solido è stata fatta nel 1996 in base alle raccomandazioni emanate dai C.D.C. di Atlanta, riguardanti la diagnostica dei micobatteri^{3,6}. Il sistema utilizzato in quel periodo era il BBL – MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube, Becton Dickinson, Milano).

L'inoculo della provetta avveniva utilizzando una pipetta Pasteur sterile e così anche il prelievo di un'aliquota di brodo per l'allestimento del vetrino nel caso di riscontro di fluorescenza. Tutte queste fasi operative venivano svolte in una stanza non dedicata alla diagnostica dei micobatteri. Le provette inoculate, così come i tubi di L.J. venivano incubati in un termostato a 37°C, utilizzato per tutti i materiali processati in microbiologia. I problemi di sicurezza, sia dell'ambiente (mancanza di spazi dedicati), sia del personale (manualità), hanno portato a scegliere nel 1998 un sistema automatico non radiometrico: BACTEC 9000 MB. L'inoculo della bottiglia si effettua con una siringa ad ago fisso, così come il prelievo di un'aliquota di brodocoltura, nel caso di flaconi segnalati come positivi per l'allestimento di un vetrino, atto ad evidenziare l'alcol-acido resistenza dei microrganismi sviluppati.

Il sistema BACTEC 9000 MB dispone anche di bottiglie (Myco/F Lytic) inoculabili direttamente con sangue intero⁶. Nel 2002 è stato scelto il sistema MGIT 960: si tratta di uno strumento in grado di monitorare un totale di 960 provette BBL MGIT.

Le provette indicate come positive vengono rimosse dallo strumento per confermare i risultati attraverso prima l'allestimento di un vetrino, e dopo l'isolamento e l'identificazione dell'organismo.

I flaconi di coltura che rimangono negativi per un minimo di 42 gg. (fino a 56gg.) e che non mostrano alcun segno di positività vengono tolti dallo strumento in quanto negativi ed eliminati. Lo strumento prevede un controllo di qualità interno, che consiste nella verifica delle principali funzioni. Il terreno solido, L.J., associato al terreno liquido, viene incubato a 37°C e controllata l'eventuale crescita settimanalmente. Nel caso di crescita di colonie sospette vengono allestiti vetrini per la conferma dell'alcol-acido resistenza. Sia per il terreno liquido (MGIT) che per quello solido (L.J.) ad ogni cambio di lotto viene effettuato un controllo di qualità, per verificarne la fertilità, utilizzando il ceppo di riferimento ATCC 27294 M. tuberculosis (ATCC: American Type Culture Collection).

Il nostro laboratorio partecipa anche ad un controllo di qualità esterno (NEQAS) che consiste nell'esecuzione dell'esame colturale di 4 campioni clinici contenenti tutti o in parte ceppi virulenti di M. tuberculosis.

Identificazione e antibiogramma

Per quanto riguarda la tipizzazione, l'antibiogramma degli isolati e l'identificazione di M. tuberculosis complex su materiali clinici mediante amplificazione genica, il nostro laboratorio fa riferimento al Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale S. Chiara di Trento.

Tabella I. Le fasi lavorative nella diagnostica delle micobatteriosi.

F1 RITIRO E REGISTRAZIONE CAMPIONI	F2 CENTRIFUGAZIONE MATERIALI LIQUIDI	F3 FLUIDIFICAZIONE MATERIALI BIOLOGICI	F4 DECONTAMINAZIONE MATERIALI BIOLOGICI
F5 PREPARAZIONE VETRINO DA CAMPIONI	F6 COLORAZIONE VETRINO	F7 LETTURA VETRINO	F8 PREPARAZIONE TERRENI LIQUIDI DI COLTURA
F9 INOCULAZIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO NEI TERRENI DI COLTURA E CONSERVAZIONE DI PARTE DEI CAMPIONI IN FREEZER	F10 LETTURA DELLE COLTURE DURANTE E A FINE INCUBAZIONE	F11 PREPARAZIONE VETRINO DA TERRENI SOLIDI	F12 PREPARAZIONE VETRINO DA TERRENI LIQUIDI
F13 COLORAZIONE VETRINI	F14 LETTURA VETRINI	F15 ALLESTIMENTO SUBCOLTURE	F16 PREPARAZIONE PER LA SPEDIZIONE DI CEPPI
F17 MANUTENZIONE BACTEC	F18 MANUTENZIONE CENTRIFUGHE	F19 MANUTENZIONE THERMOSTATO	F20 GESTIONE CARICO/SCARICO MAGAZZINO
F21 SMALTIMENTO RIFIUTI BIOLOGICI	F22 SMALTIMENTO LIQUIDI DI COLORAZIONE VETRINI	F23 PULIZIA BANCONI, CAPPALLO, CENTRIFUGA E AMBIENTE DI LAVORO	
F: Fase lavorativa			

L'identificazione di *M. tuberculosis complex*, *M. avium complex* e *M. kansasii* viene effettuata con sonde DNA (BD Probe Tec ET). Se il ceppo in esame non è identificato con queste sonde, viene spedito al centro di riferimento Villa Marelli di Milano.

Per quanto riguarda l'antibiogramma dei ceppi di *M. tuberculosis complex* viene eseguito con il sistema BACTEC MGIT960 SIRE, procedimento qualitativo rapido per analizzare la suscettibilità a streptomicina, isoniazide, rifampicina ed etambutolo. Viene inoltre testata la suscettibilità alla pirazinamide. Per ceppi di *M. avium complex* il test di sensibilità ai farmaci viene eseguito presso il Laboratorio di Villa Marelli.

Materiali

Il tipo di materiale è rappresentato per lo più da materiali respiratori (escreato broncoaspirato, aspirato tracheale, broncolavaggio) ed urina; altri materiali trattati sono stati: liquidi cavitari, pus, sangue proveniente da pazienti affetti da HIV, feci, biopsia. Fino al 1995 la raccolta, la conservazione, il trasporto e l'accettazione dei campioni non erano standardizzate. I campioni pervenivano in laboratorio nell'arco della giornata, compreso il sabato e la domenica, con la processazione in tempi spesso lontani dalla raccolta,

con rischio di sovracontaminazione. A partire dal 1996 sono stati definiti protocolli per la raccolta dei materiali, la loro conservazione, il trasporto e l'accettazione (Tabella I). Per quanto concerne la tipologia dei campioni per la ricerca dei micobatteri la novità più significativa riguarda i campioni urinari: si è passati dalla raccolta delle urine delle 24 ore a quella dei tre campioni raccolti in giorni diversi, con la tecnica del primo mitto. Questa modalità ha portato un miglioramento sia in termini di qualità che di sicurezza per la minor quantità di materiale da processare. Per il trasporto dei campioni al laboratorio vengono utilizzati contenitori secondari dotati di supporti che mantengono il campione in posizione verticale; questi contenitori sono in plastica resistenti ai disinfettanti chimici. La ricezione dei campioni avviene in una stanza dedicata (per tutto il laboratorio) o direttamente nella stanza della microbiologia. Il trasporto dei campioni al laboratorio utilizzando contenitori secondari chiusi, ha migliorato la sicurezza sia degli operatori che dell'ambiente di lavoro.

Per la conservazione è stato stabilito di tenere i campioni a 4° C per un massimo di due giorni (periodo per il quale è preservata la vitalità dei micobatteri), qualora non fosse possibile processarli in giornata. Fanno eccezione le emocolture che vanno conservate a temperatura ambiente; per

Tabella II. Tempi medi di rilevazione.

<i>Tipo di terreno</i>	<i>MGIT manuale</i>	<i>BACTEC 9000</i>	<i>MGIT 960</i>	<i>Lowenstein Jensen</i>
Campioni isolati	31	51	70	105
Tempo medio di rilevazione in gg.	19	18	15	31
Intervallo dei tempi di rilevazione in gg.	3-42	6-40	6-35	18-40

questo tipo di campione il laboratorio fornisce al reparto richiedente i flaconi idonei (inizialmente provette Isolator, attualmente flaconi dedicati quale Bactec Myco/F Lytic (Becton Dickinson).

I campioni non idonei vengono rifiutati segnalando al clinico i motivi di tale rifiuto.

Risultati

Nel periodo compreso tra gennaio 1996 e dicembre 2004, sono stati esaminati 8.822 campioni, da cui sono stati isolati 152 micobatteri (1,7% dei totali); tra questi 106 (70%) sono MTC e 46 (30%) sono MNT.

Una precisazione va fatta sulla percentuale dei campioni positivi: essa non rappresenta la reale incidenza e tanto meno l'effettivo numero dei campioni positivi perché nel caso di un paziente con più campioni, risulta un solo isolato tipizzato.

I campioni clinici in cui con maggior frequenza si riscontra la positività, sono costituiti da materiali respiratori (escreato, broncoaspirato, aspirato tracheale).

Nell'anno 2000 la percentuale di contaminazione ha superato abbondantemente il 5%, per cui in quel periodo, sono state apportate alcune misure correttive, sia nella fase operativa prefluidificazione del campione con agente mucolitico, utilizzo di NaOH più concentrato, controllo dei tempi che nell'utilizzo della cabina a flusso laminare (programma di manutenzione e/o sostituzione filtri).

Il *M. gordonae* rappresenta il 48% dei MNT, mentre il resto è costituito da: *M. avium* complex, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*. Nella Tabella II dei 152 campioni positivi per micobatteri, 31 sono stati rilevati con il MGIT manuale, 51 con il BACTEC 9000F/MB e 70 con l'attuale MGIT960, mentre il terreno solido (Lowenstein-Jensen) ha rilevato una positività in soli 105 campioni. I tempi medi di rilevazione per il terreno liquido sono rispettivamente: 19 gg. per il MGIT manuale (con un intervallo di tempo tra 3 e 42 gg.), 18 gg. per il BACTEC 9000F/MB (con un intervallo tra 6 e 40 gg.) e 15 gg. per il MGIT960 (con un intervallo tra 6 e 35 gg.). Per il terreno L.J. il tempo medio di rilevazione è di 31 gg. (con un intervallo tra 18 e 40 gg.). A partire dall'anno 2000 è stato possibile fare un confronto tra il numero dei campioni positivi all'esame colturale e quello dei campioni positivi all'esame microscopico diretto. E' risultato che solo un 42% dei campioni rilevati positivi con l'esame colturale è anche positivo all'esame microscopico. In particolare: dei 106 campioni positivi all'esame colturale, 69 erano MTC e 37 MNT; dei 43 con esame microscopico diretto positivo, 35 erano MTC e 8 MNT. Si fa presente inoltre che da gennaio 1999 a dicembre 2004 sono stati inviati al Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale S. Chiara di Trento 135 campioni clinici per l'identifi-

cazione del *M. tuberculosis* complex con amplificazione genica.

L'analisi dei processi lavorativi nel nostro laboratorio è stata eseguita utilizzando il Metodo delle Congruenze Organizzative^{7,8}. Il metodo prevede l'analisi dei possibili rischi che possono trovare origine in ognuna delle attività elementari della fasi lavorative. L'analisi dei processi di lavoro non ha portato alla semplice stesura di un manuale di sicurezza, ma a cambiamenti operativi e strutturali, in particolare nella sezione di Micobatteriologia. Tali cambiamenti, tecnici e strutturali, imposti dal D.Lgs. 626/94, erano necessari data anche la volontà di conseguire un accreditamento professionale del nostro laboratorio.

I cambiamenti operativi più importanti attuati nel periodo 1996-2004 hanno interessato le varie fasi lavorative: (a) il trasporto e la consegna dei campioni con contenitori secondari di sicurezza; (b) l'utilizzo di siringhe ad ago fisso; (c) l'utilizzo di una colorazione con carbolfucina a freddo (Kinyoun) o con fluorocromi (auramina, rodamina); (d) la scelta di un sistema automatico per la coltura quale il MGIT 960.

La prevenzione sanitaria del rischio biologico fa parte, insieme alle misure tecniche, organizzative e procedurali, del complesso delle misure preventive previste dalla normativa vigente in materia di igiene e sicurezza sul lavoro, ed in particolare dal titolo VIII del D.Lgs. 626/94.

Il Servizio del Medico Competente dell'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari della Provincia di Trento nel settembre 1996 ha predisposto per gli operatori sanitari un protocollo finalizzato alla prevenzione della malattia tubercolare.

Il protocollo contempla interventi differenziati (I.D. di Mantoux, valutazione clinico radiologica, eventuale vaccinazione, cura e/o chemioprophilassi). Inoltre, per gli operatori sanitari di reparti con più di sei casi/anno di pazienti ricoverati con TBC trasmissibile e per il personale dei laboratori di Microbiologia, il protocollo prevede una sorveglianza sanitaria periodica con Mantoux annuale. Oltre al programma di prevenzione, sono state adottate misure standard di controllo ed intervento post-esposizione con denuncia dell'incidente e/o dell'infortunio^{9,10}.

Discussione

Non vi è dubbio che ripercorrendo gli anni 1996/2004, la diagnostica delle micobatteriosi presso il Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia dell'Ospedale di Rovereto è notevolmente migliorata sia come iter diagnostico, sia come riorganizzazione del laboratorio, rendendola più rapida ed affidabile. Miglioramenti sono stati apportati ad ognuna delle quattro fasi precedentemente trattate.

Per quanto concerne la fase preanalitica è stato definito un protocollo sulle modalità di raccolta, trasporto ed accettazione dei campioni clinici ed adeguando i vari aspetti della fase analitica alle linee guida (trattamento del campione nella fase di fluidificazione e decontaminazione, esame microscopico e colturale).

Di pari passo sono stati apportati cambiamenti sia operativi che strutturali imposti, i primi dal D. Lgs. 626/94 e gli altri resi necessari data la volontà di conseguire un Accredimento Professionale della struttura.

E' stato proprio il processo di accreditamento che ha dato un grosso input nel percorso di miglioramento e adeguamento. Infatti nel 1999 il nostro laboratorio ha ottenuto un Accredimento Condizionato per la parziale non aderenza ad alcuni standard: "StC1 spazi insufficienti in microbiologia, StC7 condizionamento non autonomo della stanza per diagnostica di micobatteri; nei casi suddetti si tratta di carenze strutturali che limitano notevolmente la funzionalità e la sicurezza del servizio".

Con la realizzazione di una area dedicata esclusivamente a tale diagnostica, questi due requisiti sono stati soddisfatti, ottenendo così l'Accreditamento pieno da parte del CALC (Comitato per l'Accreditamento dei Laboratori Clinici) nel gennaio 2002.

In particolare, i cambiamenti strutturali sono stati notevoli: da uno spazio comune a tutta la microbiologia, nel 1997 si è passati ad un piccolo locale dedicato alla diagnostica micobatterologica, con apertura diretta nel corridoio e senza prefiltro. In seguito (2001) si è ottenuta un'area dedicata a tale diagnostica, conforme ai requisiti richiesti: stanza con congrua metratura, con accesso esterno al laboratorio e dotata all'ingresso di una zona filtro, con un impianto di aerazione specifico, indipendente dal resto del laboratorio che assicura un flusso d'aria dall'esterno verso l'interno senza ricircolo e tale da non inficiare l'efficienza della cabina a flusso laminare.

In questa stanza si trovano tutte le attrezzature necessarie alla diagnostica: cabina a flusso laminare di classe II, cappa chimica per le colorazioni, strumento MGIT 960, termostato a 37°C per i terreni solidi, centrifuga refrigerata con coperchi di sicurezza, nonché un terminale di lavoro. Inoltre, in essa si trovano i DPI (Dispositivi Individuali di Sicurezza) quali camici monouso e maschere facciali di sicurezza, necessari per il lavoro e per eventuali incidenti e le attrezzature necessarie per eseguire la procedura in qualità e sicurezza.

Non meno importanti però sono stati i cambiamenti apportati in questo periodo ai vari momenti operativi della fase analitica: a) l'esame colturale viene sempre associato all'esame microscopico, indipendentemente dalla richiesta, mentre la biologia molecolare con amplificazione in prima battuta sul campione biologico viene effettuata solo su indicazioni cliniche motivate e valutate e su particolari campioni (es. liquor); b) l'ottimizzazione del processo fluidificazione-decontaminazione del campione, con il pretrattamento dei campioni respiratori con un agente mucolitico; c) monitoraggio della percentuale di contaminazione dei campioni che ha permesso di controllare e modificare tale processo, nonché di verificare altri fattori che potevano influenzarlo, come l'efficienza della cabina a flusso laminare.

A tal proposito, in un intervento programmato di manutenzione, risultava l'usura dei filtri HEPA (high-efficiency particulate air) e quindi la necessità di sostituirli. Questo dava spiegazione del maggior numero di campioni contaminati che avevamo in quel periodo, in quanto la cabina di biosicurezza inefficiente, pur assicurando la protezione dell'operatore, non garantiva la protezione del prodotto; d) per l'esame microscopico, c'è stato un miglioramento sia in termini di qualità che di sicurezza: l'allestimento del vetrino, dopo aver sottoposto il campione alla fluidificazione-decontaminazione e l'adozione della colorazione con fluorocromi, ha portato ad una maggior sensibilità di tale esame ed a una riduzione dei tempi di risposta. Indubbiamente l'utilizzo della colorazione con auramina-rodamina come screening e della colorazione di Ziehl-Neelsen per confermare la positività, svolte sotto cappa chimica, ha risolto il problema della formazione di vapori tossici di carbolfucsina con un miglioramento degli aspetti di sicurezza; e) per l'esame colturale, la svolta fondamentale per avere un miglioramento qualitativo è stata la scelta di associare un terreno liquido a un terreno solido. La maggiore efficienza dei vari terreni liquidi rispetto al solido, sia per la maggior sensibilità, che per la riduzione del tempo di rilevazione della crescita, è un dato inconfutabile. Nel nostro caso si può anche affermare che il passaggio da un sistema quale il MGIT manuale a un sistema automatico quale il BACTEC 9000 prima e il MGIT960 dopo, ha portato ad una progressiva diminuzione del tempo di positività.

Per la maggior parte dei campioni la rilevazione della positività è avvenuta prima nel terreno liquido rispetto a quello solido; alcuni campioni sono stati rilevati solo con il terreno liquido e rari solo con il solido.

Questo dato conferma la necessità di associare comunque e sempre i due terreni, liquido e solido; f) per quanto riguarda la sicurezza, il passaggio dal sistema manuale MGIT al sistema automatico BACTEC 9000 pur riducendo la manualità, ha introdotto ulteriori fattori di rischio dovuti all'utilizzo di siringhe in alcune fasi operative. Il passaggio al sistema automatico MGIT960, ha risolto questo inconveniente rendendo più sicura tutta la procedura; g) l'attuazione di un C.Q.I. per ogni seduta di colorazione e lettura e la partecipazione ad un programma di V.E.Q. hanno contribuito al miglioramento qualitativo.

Anche per l'esame colturale è stato prevista l'esecuzione sia di un C.Q.I. che la partecipazione ad un programma di qualità esterno (NEQAS); h) altri aspetti importanti da evidenziare sono: la predisposizione di istruzioni operative scritte riguardanti tutte le fasi della diagnostica delle micobatteriosi, la registrazione e la discussione del controllo di qualità e l'aggiornamento continuo del personale dirigente e tecnico sia in tema di sicurezza che di efficacia diagnostica.

Concludendo si può affermare che questo percorso ha portato il Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale di Rovereto a raggiungere i requisiti operativi, organizzativi e strutturali indispensabili per effettuare la diagnostica delle micobatteriosi e ha fatto acquisire agli operatori la consapevolezza di lavorare secondo le linee guida e nel rispetto delle norme di sicurezza (Tabella III).

Tabella III. Cambiamenti operativi e strutturali dal 1996 al 2004.

Fasi lavorative	Sicurezza: Obblighi previsti dal D. Lgs 626/94	Qualità: Rispetto delle linee guida	Accreditamento Professionale: Aderenza agli standard
Fase preanalitica	- utilizzo di contenitori per il trasporto. - minor quantità di materiale da trattare	istruzioni operative scritte per: modalità di raccolta, conservazione, trasporto e accettazione dei campioni.	Istruzioni operative scritte
Fluidificazione-decontaminazione	- uso di contenitori con tappo a vite - procedure atte ad evitare formazione di aerosol	- pretrattamento dei campioni respiratori. - monitoraggio della percentuale di contaminazione.	Istruzioni operative scritte
Esame microscopico	- colorazione con fluorocromi. - utilizzo della cappa chimica per le colorazioni.	- vetrino da materiale trattato e concentrato. - colorazione di screening: A/R. - colorazione di conferma: Z/N. - riduzione dei tempi di risposta. - esecuzione di CQI e VEQ.	- area dedicata alla diagnostica con sistema di aria condizionata indipendente. - presenza di cappa chimica.
Esame colturale	- utilizzo di un sistema automatico con riduzione della manualità. - programma di manutenzione per la cabina a flusso laminare. - area dedicata alla diagnostica.	- esame colturale sempre associato a quello microscopico. - sistema automatico con terreno liquido. - riduzione dei tempi di risposta. - esecuzione di un CQI e VEQ.	area dedicata alla diagnostica con i requisiti strutturali richiesti.

A/R: auramina/rodamina Z/N: Ziehl/Neelsen

Bibliografia

1. Pfyffer GE, Brown Elliott BA, Wallace RJ. *Micobacterium: General Characteristics, Isolation and Staining Procedures*. In: Murray P, Baron EJ, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 2003. pp. 532-59.
2. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR Jr, Good RC. The resurgence of Tuberculosis: is your Laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31:767-70.
3. Ministero della Salute. *Manuale Tecnico per la diagnosi microbiologica della Tuberculosis*, 2004. Javetz E, Helmick J L, Adelberg E A. *Microbiologia Medica*, Padova: Piccin Editore; 1982.
4. Kent PT, Kubica GP. Digestion-decontamination procedures. In: *Public health mycobacteriology: A guide for the level III laboratory*. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Service.; 1985. pp. 36-46.
5. Piersimoni C. Il ruolo del Laboratorio nella diagnosi della tubercolosi e delle infezioni da Micobatteri non tubercolari. *Microbiologia Medica*, 2003; 18:250-5.
6. Siddiqui SH. Blood culture for mycobacteria: Bactec Method. In: Isemberg HD, ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol. 1. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992.
7. Schinella M, Cali A M, Gualdi P. A proposito della 626/94. Il Metodo delle Congruenze Organizzative applicato al Laboratorio dell'Ospedale di Rovereto: area di Microbiologia. *Riv Med Lab* 2000; 1:20-6.
8. Maggi B. Razionalità e benessere. Studio interdisciplinare dell'organizzazione. Gruppo Editoriale Fabbri, Bompiani, Sonzogno, Etas S.p.A.; 1990.
9. APSS Provincia Autonoma di Trento. *La prevenzione delle infezioni occupazionali*; 1998. p. 43-59.
10. National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Protection of laboratory workers from infections diseases transmitted by blood and tissue. Proposed guidelines 7(9)*. Villanova, NCCLS, 1987 (NCCLS Doc. M. 29-P).