

Linee guida NCCLS e successivi tentativi di standardizzazione nei test di sensibilità per *Mycobacterium tuberculosis* complex: aspetti tecnici

G. Ruggiero, P. Ricordi, A. Rigon, C. Scarparo

Centro di Riferimento della Regione Veneto per la Diagnostica delle Infezioni da Micobatteri,
Unità Operativa di Microbiologia e Virologia, Ospedale "San Bortolo", Vicenza

Introduzione

I test di sensibilità *in vitro* per *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) rispondono a tre esigenze principali: a) guida nella scelta iniziale dei farmaci; b) conferma della comparsa di farmaco-resistenza e/o del fallimento terapeutico e guida nella scelta di farmaci alternativi; c) stima della prevalenza della farmaco-resistenza primaria o acquisita nella comunità. Per l'esecuzione del test è in ogni caso essenziale l'utilizzo di una tecnica affidabile.

I Centers for Disease Control and Prevention (CDC) raccomandano: a) l'esecuzione del test di sensibilità su tutti i ceppi di MTC di primo isolamento; b) la comunicazione del risultato del test al clinico il più rapidamente possibile e comunque entro 15-30 giorni dal ricevimento del campione; c) l'esecuzione di un successivo test di sensibilità sul ceppo isolato da colture che non si negativizzano entro 3 mesi dall'inizio della terapia o, se esiste evidenza clinica di un fallimento terapeutico (1).

Il metodo più largamente usato per il test di sensibilità per MTC è quello delle proporzioni secondo il quale, se in una popolazione micobatterica è presente più del 1% di mutanti resistenti ad un farmaco, tale popolazione è da considerarsi resistente in quanto la percentuale suddetta è destinata ad aumentare rapidamente per effetto della pressione selettiva esercitata da una terapia che utilizza il farmaco in questione.

In seguito vengono descritti due diversi metodi per l'esecuzione dei test di sensibilità del MTC: il metodo delle proporzioni su terreno agarizzato Middlebrook 7H10, considerato lo standard di riferimento per il National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), ed il metodo delle proporzioni modificato su terreno radiometrico, considerato il "golden standard" dalla letteratura internazionale.

Farmaci antitubercolari

I farmaci in polvere devono sempre riportare la potenza (μg di farmaco attivo per mg di polvere del

prodotto) e la data di scadenza. Le quantità di polvere o di diluente necessari per la preparazione di una soluzione standard possono essere calcolate utilizzando le seguenti formule.

- $\text{Peso (mg)} = \text{Volume della soluzione (ml)} \times \text{Concentrazione desiderata } (\mu\text{g/ml}) / \text{Potenza } (\mu\text{g/ml})$.

- $\text{Volume (ml)} = \text{Peso (mg)} \times \text{Potenza } (\mu\text{g/ml}) / \text{Concentrazione desiderata } (\mu\text{g/ml})$

Le soluzioni madre devono essere: a) preparate con acqua distillata sterile ad una concentrazione di almeno 1000 $\mu\text{g/ml}$ o dieci volte superiore rispetto alla più alta concentrazione da testare; b) sterilizzate per filtrazione (pori da 0.22 μm di diametro) scartando la prima parte (10-15%) della soluzione che passa attraverso il filtro. Per i farmaci non solubili direttamente in acqua, si deve utilizzare la minima quantità di solvente necessaria a sciogliere la polvere, diluendo poi con acqua distillata o appropriato tampone per ottenere la concentrazione desiderata. Queste soluzioni sono autosterilizzanti. Le soluzioni madre possono essere conservate a -70°C per circa 12 mesi.

La concentrazione critica per ciascun farmaco è quella che inibisce la crescita della maggior parte dei microrganismi di un ceppo selvaggio di MTC, senza apprezzabili effetti sulla crescita di tutti i mutanti resistenti. Nella Tabella I sono riportate le concentrazioni da testare nei vari terreni. La piraminazide è un farmaco attivo contro il MTC solo a bassi valori di pH (4,7-5,5) che tuttavia inibiscono la crescita di molti ceppi di MTC rendendo problematica l'esecuzione del test di sensibilità a questo farmaco, in particolar modo sui terreni solidi. Il terreno liquido impiegato a tale scopo nel sistema radiometrico ha pH 6, che è a metà strada fra quello ottimale per l'attività del farmaco e quello ottimale per la crescita del MTC.

Il pannello di farmaci di prima scelta per il test di sensibilità per MTC, secondo le indicazioni NCCLS, comprende l'isoniazide (INH) a due concentrazioni (critica ed alta concentrazione), la rifampicina (RIF), l'etambutolo (ETA) e la pirazinamide (PZA). Tale pannello può essere ampliato includendo la streptomina (STR), considerata dal secondo tentativo di standar-

Tabella I. Farmaci antitubercolari e loro concentrazioni nei diversi terreni.

Farmaco	Solvente	Concentrazione in µg/ml		
		Bactec 12B	7H10	7H11
Isoniazide	Acqua distillata	0.1	0.2	0.2
		0.4	1.0	1.0
Rifampicina	Dimetilsolfossido	2.0	1.0	1.0
Etambutolo	Acqua distillata	2.5	5.0	7.5
		7.5	-	-
Streptomicina	Acqua distillata	2.0	2.0	2.0
		6.0	10	10
Pirazinamide	Acqua distillata	100 ^b	NR ^c	NR ^c
Capreomicina	Acqua distillata	1.25 ^a	10	10
Etionamide	Dimetilsolfossido	1.25 ^a	5.0	10
Kanamicina	Acqua distillata	5.0 ^a	5.0	6.0
Ofloxacina	Acqua distillata	2.0	2.0	2.0
Rifabutina	Metanolo	1.0 ^a	0.5	0.5
Ac. p-aminosalicilico	Acqua distillata	4.0	2.0	8.0

^aPfyyfer GE, et al., 1999 (4); ^bpH = 6; ^cNR: non raccomandato.

dizzazione NCCLS (2, 3) come farmaco di seconda scelta. La capreomicina, l'etionamide, la kanamicina, l'ofloxacina, la rifabutina e l'acido p-aminosalicilico sono farmaci di seconda scelta e dovrebbero essere testati solo in laboratori di riferimento in presenza di accertate resistenze ai farmaci di prima scelta (4).

Test di sensibilità su terreni agarizzati (7H10 – 7H11)

Per il test di sensibilità per MTC viene raccomandato il terreno agarizzato di Middlebrook 7H10 (Fig. 1). Il terreno di Middlebrook 7H11, in grado di evidenziare meglio i ceppi di MTC INH-resistenti, rappresenta una valida alternativa. Il terreno 7H10 viene preparato dalla polvere deidratata, autoclavato e, alla temperatura di 50-56°C addizionato di OADC (acido oleico, albumina, destrosio e catalasi) e del farmaco appropriato. Vengono utilizzate delle piastre di Petri divise a quadranti, in ciascuno dei quali vengono versati 5 mL di terreno. Nel primo quadrante (controllo), il terreno è privo di farmaci, mentre nei rimanenti tre quadranti esso contiene differenti concentrazioni di uno o più farmaci. Un metodo alternativo ai farmaci in polvere è l'utilizzo di dischetti impregnati con una quantità nota di farmaco, posti all'interno dei quadranti (Tab. II) e ricoperti con 5 mL di terreno ancora liquido. Dopo solidificazione del terreno le piastre devono essere lasciate per una notte a temperatura ambiente per favorire la diffusione del farmaco e poi stoccate (4°C) in buste di plastica al buio per circa 1 mese.

Per l'inoculo del ceppo di MTC, prelevare 5-10 colonie e trasferirle in una provetta sterile con tappo a vite contenente 4 mL di brodo di Middlebrook 7H9 e 6-10 palline di vetro. Vortexare per alcuni minuti e lasciare sedimentare le particelle più grossolane per circa 30 minuti. Prelevare il supernatante e trasferirlo in una seconda provetta aggiustando poi la torbidità della sospensione con brodo 7H9 fino allo standard 1 di Mc

Figura 1. Test di sensibilità sui terreni agarizzati (Middlebrook 7H10, 7H11).

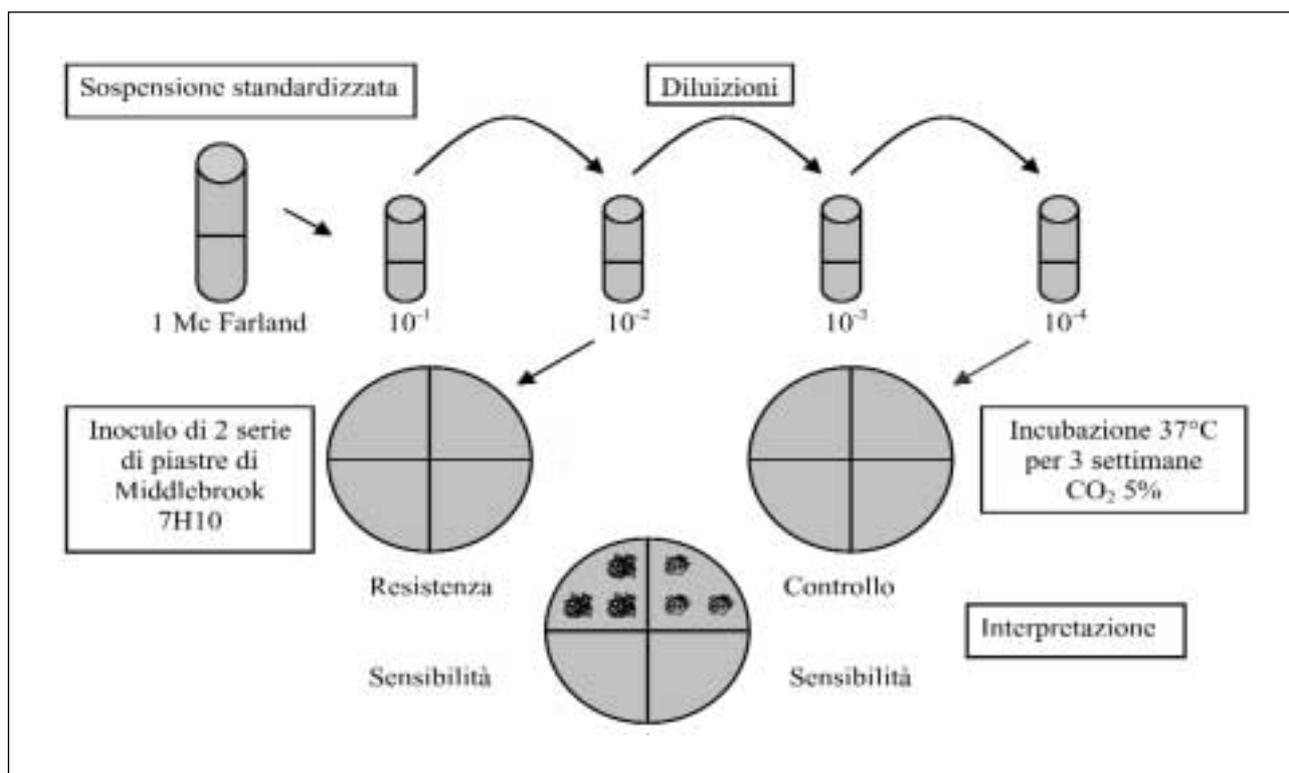


Tabella II. Distribuzione dei dischetti con il farmaco secondo le indicazioni NCCLS.

Piastra	Quadrante	Farmaco	Concentrazione del farmaco (µg/ml)	
			nel dischetto	nel terreno
1	I	Controllo 1	-	-
	II	Isoniazide	1.0	0.2
	III	Isoniazide	5.0	1.0
	IV	Etambutolo	25	5.0
2	I	Controllo 2	-	-
	II	Streptomicina	10	2.0
	III	Streptomicina	50	10
	IV	Rifampicina	5.0	1.0

Farland. Preparare delle diluizioni 10^{-2} e 10^{-4} della suddetta sospensione con acqua distillata sterile. Inoculare i vari quadranti di una prima serie di piastre con la sospensione 10^{-2} , ponendo con una pipetta Pasteur una goccia ai tre angoli di ciascun quadrante. Inoculare una seconda serie di piastre con la diluizione 10^{-4} . Inoculare una piastra di agar sangue ed una di Middlebrook 7H11 con 1-2 gocce della sospensione non diluita. Lasciare asciugare le piastre non capovolte, a temperatura ambiente, sotto cappa di sicurezza biologica, per circa 1 ora. Chiudere ciascuna piastra in una busta di polietilene permeabile alla CO_2 e porre in incubatore a $37^\circ C$ in atmosfera 5-10% di CO_2 . Esaminare la piastra di agar sangue per qualche giorno per controllare la purezza dell'inoculo e ripetere il test in presenza di contaminazione. Esaminare i quadranti di controllo settimanalmente ed interpretare i risul-

tati (non prima di 3 settimane) valutando la serie di piastre che presenta sul quadrante di controllo un numero contabile di colonie (idealmente 50-100). Test di sensibilità con controlli < a 50 colonie possono mostrare false sensibilità. Test di sensibilità con controlli che mostrano una crescita confluenta possono essere interpretati solo se il ceppo risulta sensibile ai diversi farmaci, mentre la presenza di resistenze può essere dovuta ad un inoculo troppo pesante. Se il numero di colonie presenti sul terreno col farmaco è superiore all'1% del numero di colonie sul terreno di controllo si considera il ceppo resistente a quel farmaco, altrimenti sensibile.

Test di sensibilità ai farmaci maggiori (STR INH, RIF, ETA) sul terreno radiometrico BACTEC 460

Ricostituire i farmaci liofilizzati (Bactec S.I.R.E.: STR, INH, RIF, ETA, Becton Dickinson) con 5 mL di acqua deionizzata sterile od utilizzare i farmaci in polvere. Testare preventivamente i flaconi Bactec 12B (Becton Dickinson) con lo strumento Bactec 460 TB per stabilirvi un'atmosfera al 5% di CO_2 . Utilizzare 4 flaconi 12B ed inoculare 0.1 mL di ciascuno farmaco nel corrispondente flacone (Fig. 2). Il test di sensibilità col sistema radiometrico prevede la lettura giornaliera dei flaconi fino a quando il controllo non raggiunge un Indice di Crescita (Growth Index) (GI) > 30. Qualora il laboratorio non sia operativo durante il fine settimana è preferibile allestire il test solo al sabato (o al venerdì) ed iniziare il lunedì la lettura dei flaconi. Per la sospensione micobatterica

Figura 2. Test di sensibilità su terreno radiometrico BACTEC 460.

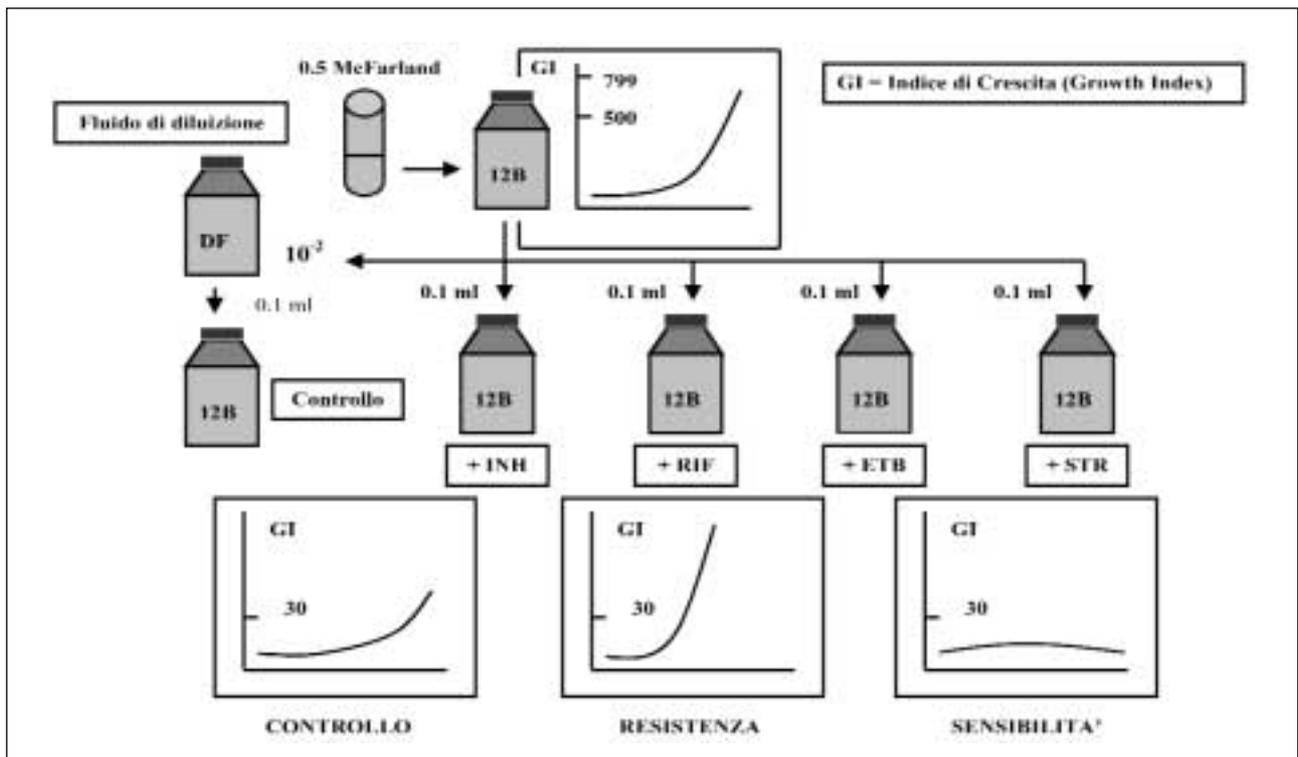
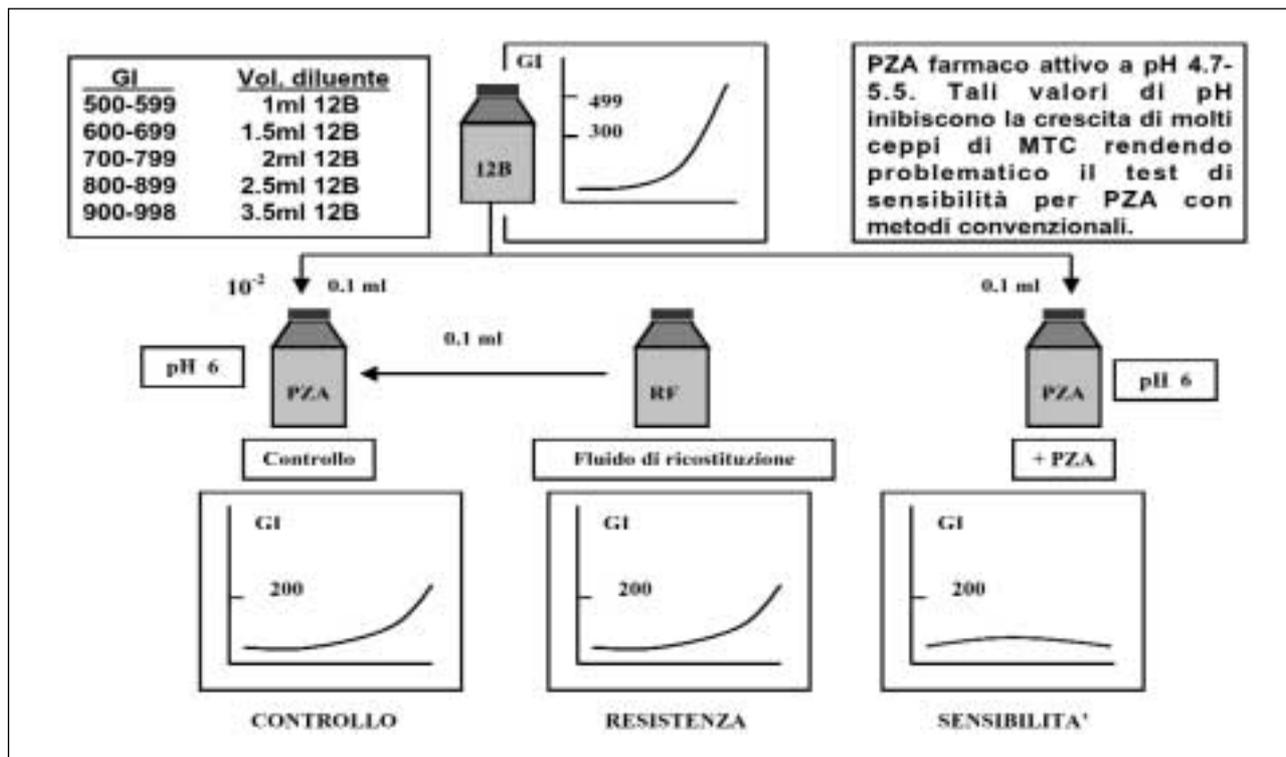


Figura 3. Test di sensibilità della Pirazinamide su terreno radiometrico BACTEC 460.



di inoculo, qualora si parta da una coltura in terreno radiometrico, il flacone deve avere valori di GI compresi fra 500 e 799 per effettuare direttamente l'inoculo, se il GI è \geq a 800 occorre diluire 1 mL di tale coltura con 1 mL Diluting Fluid (DF) (Becton Dickinson) prima di effettuare l'inoculo.

Qualora si parta da colture in terreno liquido non radiometrico o da colture solide (vedi indicazioni precedenti), occorre diluire con fluido di diluizione la sospensione micobatterica fino ad ottenere una torbidità pari a quella dello standard 1 di McFarland, o pari a quella dello standard 0.5 di McFarland se si segue il programma che non prevede la lettura durante il fine settimana.

Inoculare con 0.1 mL di sospensione micobatterica ognuno dei flaconi con il farmaco, usando una siringa da tuberculina con ago fisso.

Con alcune gocce della sospensione di inoculo eseguire delle sub-colture su piastre di agar sangue e Middlebrook 7H11. Preparare una diluizione 1/100 della sospensione di inoculo con fluido di diluizione ed inoculare il flacone di controllo con 0.1 mL di tale sospensione diluita. Incubare a 37 °C. Esaminare le piastre di agar sangue e di 7H11 per verificare la purezza dell'inoculo e la presenza di un solo ceppo micobatterico. Testare i flaconi ogni giorno con lo strumento Bactec 460 per un minimo di 4 giorni ed un massimo di 14. Interpretare i risultati quando il GI del controllo risulta >30 . Se il GI è >30 già dopo 1-2 giorni, l'inoculo è troppo pesante e occorre ripetere il test. Se il GI è >30 già al 3° giorno, occorre incubare per altre 24 ore prima di interpretare i risultati. Se il GI non raggiunge il valore di 30 entro 14 giorni di incubazione occorre ripetere il test.

Per i laboratori non operativi durante il fine settimana, la lettura del lunedì non deve essere considerata dato che essa rappresenta la somma di più giorni.

Calcolare, per il controllo e per ciascun flacone antibiotato, la differenza (Δ GI) fra il GI dell'ultima lettura e quella del giorno precedente. Se il Δ GI del controllo è superiore al Δ GI del flacone col farmaco il ceppo è da considerare sensibile a tale farmaco, in caso contrario è da considerare resistente. Se il Δ GI del controllo è uguale al Δ GI del flacone antibiotato proseguire la lettura dei flaconi per altri 2-3 giorni, in tal modo è spesso possibile orientarsi verso la sensibilità o la resistenza; qualora però non emergano indicazioni chiare l'isolato deve essere considerato parzialmente resistente. Se il GI del flacone col farmaco supera 500 in una delle letture giornaliere e rimane >500 il giorno successivo si deve considerare il ceppo come resistente al farmaco indipendentemente dal valore del Δ GI.

Sensibilità alla Pirazinamide

Ricostituire la pirazinamide liofilizzata (PZA drug kit, Becton Dickinson) con 5 mL Reconstitution Fluid (RF) (Becton Dickinson) che favorisce la crescita dei micobatteri od utilizzare il farmaco in polvere. Testare preventivamente i flaconi PZA test medium (a pH 6) (Becton Dickinson) con lo strumento Bactec 460 TB per stabilirvi un'atmosfera al 5% di CO₂.

Usare per l'inoculo una sub-coltura in Bactec 12B avente un GI compreso fra 300 e 499. Qualora il GI

sia >500 e <999 diluire la sub-coltura con brodo Bactec 12B secondo lo schema riportato in Figura 3. Aggiungere ad un flacone 0.1 mL di soluzione di pirazinamide ed, ad un secondo flacone, di controllo, 0.1 mL di soluzione di RF. Usando una siringa da insulina, aggiungere 0.1 mL della sospensione di inoculo sia al flacone con il farmaco che al flacone di controllo. Inoculare con alcune gocce della sospensione di inoculo la piastra di agar sangue e quella di 7H11. Incubare a 37°C. Esaminare le piastre di agar sangue e di 7H11, per escludere un' eventuale contaminazione o la presenza di una popolazione micobatterica mista. Testare giornalmente i flaconi per un minimo di 4 giorni, e quando il flacone di controllo raggiunge un GI di 200 interpretare i risultati.

Calcolare il rapporto percentuale fra il GI del flacone col farmaco e quello del controllo. Se il GI del flacone col farmaco è inferiore al 9% del GI del flacone di controllo il ceppo deve essere considerato sensibile; se il GI del flacone col farmaco è superiore all' 11% del GI del flacone di controllo il ceppo deve essere considerato resistente. Valori compresi fra 9 e 11% sono considerati "borderline". Se il GI del controllo non raggiunge il valore di 200 entro 12 giorni occorre ripetere il test. Riportare la concentrazione della pirazinamide e l'interpretazione del test.

Controllo di qualità

La performance dei farmaci può essere controllata utilizzando ceppi ATCC di *M. tuberculosis* resistenti a ciascuno dei farmaci maggiori o utilizzando isolati clinici resistenti ai singoli farmaci. Il ceppo H37Rv (ATCC 27294), sensibile a tutti i farmaci, deve essere testato per ogni nuovo lotto di terreno e almeno una volta alla settimana; il test deve essere ripetuto in presenza di resistenza ad uno qualsiasi dei farmaci o qualora il terreno di controllo non registri alcuna crescita.

Discussione e Conclusioni

Negli ultimi anni l'aumentata incidenza di casi di tubercolosi e di ceppi di MTC multifarmaco-resistenti hanno reso necessarie delle raccomandazioni da parte dei CDC per l'esecuzione del test di sensibilità (1). Il metodo delle proporzioni in agar 7H10 viene consi-

derato dall'NCCLS lo standard di riferimento. Tuttavia, questo metodo, alquanto complesso nella sua esecuzione tecnica, richiede tempi piuttosto lunghi (circa 3 settimane). Una rapida diagnosi di tubercolosi ed un test di sensibilità disponibile in tempi brevi rappresentano delle necessità indispensabili per un corretto approccio terapeutico ed un efficiente controllo della malattia.

Il test di sensibilità per MTC con il sistema radiometrico Bactec viene considerato il "golden standard" dalla letteratura internazionale ed è riconosciuto dall'NCCLS come valida alternativa ai terreni agarizzati, in quanto richiede tempi medi di 4-7 giorni e consente di testare anche la pirazinamide. Sulla base di queste considerazioni, solo l'esecuzione del test di sensibilità su terreno liquido radiomarcato o terreni similari consente di rispettare i tempi indicati dalle raccomandazioni dei CDC. Nel campo della micobatteriologia nuovi sistemi automatici che impiegano terreni liquidi per la coltura ed il test di sensibilità sono stati recentemente introdotti sul mercato come possibili valide alternative al sistema radiometrico. L'utilizzo di metodi standardizzati consente di avere una base di riferimento per poter valutare correttamente le performance dei nuovi sistemi affinché vengano sempre forniti al clinico dei risultati affidabili.

Bibliografia

1. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburg CR Jr, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993;31:767-77.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*; Tentative standard. NCCLS Document M24-T, December 1995.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia*, and other aerobic Actinomycetes; Tentative standard - Second edition. NCCLS Document M24-T2. Wayne, PA: NCCLS 2000; vol. 20, n. 15.
4. Pfyffer GE, Bonato DA, Ebrahimzadeh A, Cross W, Hotaling J, Kornblum J, et al. Multicenter laboratory validation of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against classical second-line and newer antimicrobial drugs by using radiometric BACTEC 460 technique and the proportion method with solid media. *J Clin Microbiol* 1999;37:3179-86.