# Proposte di linee guida per la diagnostica di laboratorio delle micobatteriosi

**M. Gallina[a], A. Berlusconi[b]**
[a] *Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia, Azienda Ospedaliera "E. Morelli", Sondalo*
[b] *Laboratorio Analisi, Ospedale Geriatrico "Pio Albergo Trivulzio", Milano*

## Introduzione

Lebbra, tubercolosi, e infezioni opportuniste sostenute da micobatteri nell'AIDS, hanno avuto il destino di accompagnare la storia dell'umanità come impegno sociale oltre che sanitario.
La lebbra non costituisce più un problema nel nostro continente, mentre la tubercolosi (TB) e le micobatteriosi in HIV e nell'età avanzata sono di rilevante attualità. La TB è la malattia infettiva più diffusa nel mondo (8.000.000 di nuovi casi/anno, con 2.000.000 di decessi/anno), e costituisce un importante problema di Sanità pubblica non solo nei paesi in via di sviluppo ma anche nei paesi industrializzati. La trasmissione del *Mycobacterium tuberculosis* (MT) avviene prevalentemente per via aerea attraverso le goccioline di Flügge e la sorgente d'infezione è l'individuo malato. I Micobatteri non tubercolari (NTM) sono ubiquitari nell'ambiente e provocano infezioni respiratorie, che richiedono la diagnosi differenziale con TB, in soggetti con immunodepressione infettiva o iatrogena o in soggetti con età avanzata e preesistenti danni al parenchima polmonare.
Nei paesi industrializzati la TB era in fase di eradicazione, ma nell'ultimo decennio del XX secolo, l'immigrazione da paesi ad elevata endemia e la diffusione dell'immunodeficienza acquisita hanno modificato questo trend e il crescente numero di casi ha colto impreparate le strutture sanitarie. Il problema è reso ancora più drammatico dall'emergente e preoccupante diffusione di forme di TB multiresistente (MDR TB), frutto di trattamento antimicobatterico inadeguato e inefficace. Si sono quindi resi necessari interventi finalizzati a ripristinare/introdurre programmi di controllo e prevenzione della malattia tubercolare. Il cardine dei programmi di controllo è interrompere la trasmissione interumana, ricorrendo all'isolamento respiratorio e all'efficace trattamento degli individui con TB attiva per impedire il contagio, che avviene anche per basse cariche microbiche, data l'elevata capacità infettante del MT.
Un programma di controllo per la TB richiede uno sforzo coordinato della comunità, le cui componenti coinvolte devono applicare strategie sinergiche, con regole condivise, descritte sotto forma di linee guida. L'Organizzazione Mondiale della Sanità, i Centers for Diseases Control di Atlanta, diverse società scientifiche nazionali e internazionali hanno predisposto linee guida per il trattamento antitubercolare, con istruzioni su procedure organizzative, terapeutiche, assistenziali.
Il coinvolgimento della disciplina di Medicina di Laboratorio, nel programma di controllo globale della TB, è fondamentale e pertanto occorre definire qual'è l'organizzazione territoriale della rete di laboratori di micobatteriologia che risulti adeguata alla domanda sanitaria e quali le loro competenze, quali sono le migliori strategie per rispondere con efficacia ai quesiti diagnostici, con quale metodologia eseguire i test diagnostici per raggiungere il massimo di efficienza.

## Organizzazione territoriale

Indicazioni per un'ottimale organizzazione territoriale si trovano nelle linee guida presentate dalla Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano (1) e nelle linee guida della Associazione Microbiologi Clinici Ospedalieri AMCLI (2).
Le linee guida della Conferenza Stato-Regioni delineano la politica sanitaria, i provvedimenti terapeutici e l'organizzazione dei servizi diagnostici di microbiologia, suggerendo per questi ultimi una articolazione in tre livelli, con competenze e bacini di utenza differenziati:
"5.5. Organizzazione dei laboratori. I laboratori devono essere classificati in base ai carichi di lavoro in tre livelli di attività: 1° livello (laboratorio di base): preparazione ed esecuzione di esame microscopico diretto e, in base al carico di attività, eventualmente di esame colturale. 2° livello (laboratorio regionale): oltre alle procedure del primo livello, esame colturale, identificazione dei MT umani e antibiogramma. Bacino di

utenza di circa 1 milione di abitanti. 3° livello (laboratorio di riferimento): esame microscopico e colturale, antibiogramma, tipizzazione MT e NTM, uso di alta tecnologia, coordinamento con gli altri laboratori per controllo di qualità, conservazione dei ceppi, corsi di aggiornamento del personale. Bacino di utenza 5-10 milioni di abitanti".

Le linee guida di tipo metodologico presentate dall'AMCLI propongono al punto 8, "Organizzazione dei laboratori di Micobatteriologia", una articolazione su tre livelli oltre al laboratorio di riferimento, precisandone meglio le competenze: il Laboratorio di 1° livello deve assicurare il trasferimento del campione a un Laboratorio di livello diagnostico superiore. Ha facoltà di eseguire il solo esame batterioscopico per esigenze di diagnosi rapida. Il Laboratorio di 2° livello deve avere un carico minimo settimanale di 20 campioni, esegue esame microscopico ed esame colturale su terreno solido e in brodo. Al Laboratorio di 3° livello compete, oltre all'attività del livello precedente, anche la tipizzazione di micobatteri, l'"eventuale" antibiogramma e identificazione diretta di MT sul materiale biologico. Per il Laboratorio di riferimento vengono proposte funzioni di identificazione completa dei micobatteri e valutazione della chemiosensibilità, identificazione rapida con metodi di biologia molecolare, impiego di tecnologie avanzate, sorveglianza epidemiologica, formazione del personale.

In una indagine del 1995 svolta dal Comitato Regionale per l'Ordinamento dei Servizi di Patologia (CROSP) per la Regione Lombardia, la situazione organizzativa territoriale era la seguente: su 390 laboratori lombardi 196 dichiaravano di eseguire l'esame microscopico, 82 l'esame colturale senza identificazione di specie, 26 con identificazione di specie, 15 con antibiogramma. Questa distribuzione dell'attività dimostra un livello di centralizzazione della diagnostica dei micobatteri ancora insufficiente e un evidente sbilancio tra esame batterioscopico e colturale.

Il Laboratorio definito di 1° livello, con connotazioni di Laboratorio generale di base, secondo le linee guida della Conferenza Stato-Regioni dovrebbe assicurare l'esecuzione dell'esame batterioscopico per bacilli alcol-acido resistenti (BAAR), non necessariamente associandovi la coltura, che verrebbe eseguita "eventualmente in base al carico di attività".

Nelle linee guida AMCLI viene precisato che l'esame batterioscopico ha motivazioni di diagnosi rapida e deve essere ripetuto in un laboratorio di livello superiore. L'esame batterioscopico diretto, su campione non omogeneizzato e arricchito, trova giustificazione nel tentativo di dimostrazione "urgente" di micobatteri a carica elevata. La negatività di tale esame estemporaneo non ha contenuto informativo utile per la sua bassa sensibilità e la mancanza di una vera standardizzazione. La ricerca microscopica corretta di BAAR nell'escreato richiede una preparazione del campione coincidente con quella richiesta per l'esame colturale. In Regione Lombardia l'esame batterioscopico per BAAR non è classificato tra gli esami eseguibili in un Laboratorio generale di base, come ad esempio la colorazione di Gram, ma tra gli esami di competenza della branca specialistica Microbiologia. In effetti, nell'esame batterioscopico dell'escreato per BAAR, la fase più delicata e a rischio, perché spesso tecnicamente trascurata, è la fase di preparazione del campione, che prevede fluidificazione-decontaminazione e arricchimento per centrifugazione sotto un preciso controllo dei tempi di esecuzione (3). Il mantenimento di una capacità esperta (skilling) nel trattare campioni per analisi micobatteriologiche richiede, per opinione diffusa, un carico di lavoro settimanale minimo di 20 campioni, per un migliaio di analisi annue. Questo carico di lavoro è idoneo a motivare la presenza, in un Laboratorio, di un settore specializzato di Microbiologia con un menù di analisi comprendente la coltura per micobatteri, che ha fase di preparazione in comune con l'esame microscopico. Appare quindi razionale che la coltura accompagni sempre un esame batterioscopico, rappresentando una sorgente di informazioni complementari indispensabili. Un carico di lavoro che superi i mille campioni annui per ricerca micobatteri difficilmente è raggiungibile dai Laboratori generali di base. Il laboratorio definito di 1° livello o Laboratorio di base dovrebbe avere sia un'essenziale funzione di controllo ed educazione alla formulazione di una domanda clinica appropriata, sia il compito di organizzare la raccolta, la conservazione adeguata e il trasferimento dei campioni biologici a strutture di livello superiore per garantire la tempestività di conferma/esclusione del sospetto di presenza di micobatteri nel campione biologico.

Il laboratorio definito di 2° livello dalle linee guida della Conferenza Stato-Regioni dovrebbe essere titolare di esame colturale, tipizzazione di MT e di antibiogramma. Il bacino di utenza di un milione di abitanti fornisce 50-70 nuovi casi di TB annue, con un numero di antibiogrammi annuale basso, e presumibilmente 3000-5000 esami colturali, che rappresentano un carico di lavoro elevato. Sembra più conveniente aumentare il numero di laboratori abilitati all'accertamento della positività microscopica e colturale per micobatteri definendo un bacino di utenza inferiore (300.000 abitanti, circa 20 nuovi casi di TB annue, 1000-2000 campioni annui esaminati), ed assicurare un bacino di utenza più ampio al laboratorio, definito Laboratorio di 3° livello diagnostico, che provvede all'identificazione di MT e NTM di maggiore diffusione e all'esecuzione di antibiogramma.

Su dimensionamento e compiti dei laboratori di riferimento entrambe le linee guida concordano sostanzialmente. È da approfondire quanto sia razionale l'attribuzione al laboratorio di riferimento, ed "eventualmente" al laboratorio di 3° livello, della competenza per la diagnosi rapida di TB mediante test di amplificazione diretta (DAT) di acidi nucleici.

**Risposta efficace della Medicina di Laboratorio ai quesiti diagnostici**

Le strategie necessarie al successo di un programma di controllo della TB vertono sui seguenti punti:
- diagnosticare e trattare gli individui con TB attiva,
- individuare i contatti stretti con malati di TB per prevenire la comparsa di nuovi casi di malattia attiva,
- attivare procedure di screening su popolazioni ad alto rischio.

È essenziale quindi impiegare metodi che siano in grado di identificare rapidamente i soggetti da isolare perché sorgenti d'infezione, di accertare nei soggetti esposti i casi d'infezione da sorvegliare e trattare per prevenire lo sviluppo di TB attiva contagiosa, di classificare correttamente nella popolazione generale i soggetti a rischio da sottoporre a screening. È necessario, inoltre disporre di metodi obiettivi per l'accurata dimostrazione della cessata contagiosità.
L'emergenza di MDR TB richiede sempre più spesso l'accertamento della suscettibilità di MT al trattamento con farmaci antimicobatterici. Tale accertamento deve avere dimostrabili garanzie di accuratezza, documentabile dai controlli di qualità interni ed esterni. I trattamenti terapeutici sono caratterizzati da tossicità epatica e renale, che va sorvegliata biochimicamente.
Negli ultimi dieci anni la Medicina di Laboratorio ha sviluppato o perfezionato la tecnologia per la diagnosi delle malattie da micobatteri, TB in particolare. Le risorse tecnologiche disponibili comportano la necessità di un utilizzo razionale atto ad evitare sia spreco di tempo e denaro, sia errate interpretazioni dei risultati analitici. L'attività di consulenza operata dalla Medicina di Laboratorio ha, tra l'altro, anche lo scopo di controllare l'appropriatezza della domanda di accertamenti microbiologici.
Di seguito, si elencano le più frequenti indicazioni/motivazioni di richiesta di indagini di laboratorio in micobatteriologia, ricavabili dalle abitudini prescrittive o da linee guida per il controllo della TB:
- "routine" microbiologica in broncopneumopatia
- sospetto clinico di TB – motivazione terapeutica
- sospetto clinico di TB contagiosa – esigenza di sanità pubblica
- soggetti a stretto contatto di malati con TB contagiosa
- suscettibilità al trattamento antimicobatterico
- monitoraggio del trattamento antimicobatterico e accertamento cessata infettività
- ammissione in collettività
- epidemiologia

Per ognuna di queste indicazioni proponiamo le strategie che sembrano più appropriate.

*Routine pneumologica*

La morbosità per TB polmonare nel 1999 in Italia (fonte Ministero Sanità) è stata di 6/100.000 abitanti (centro 7/100.000, sud 4/100.000; TB extrapolmonare 2/100.000). Poiché la morbosità per malattie polmonari è circa 200 volte più elevata (587.000 dimessi per malattie respiratorie nel 1997), l'uso di uno screening indiscriminato, basato sulla ricerca batterioscopica diretta di BAAR, è da disincentivare per lo scarso contenuto informativo dovuto alla bassa prevalenza, per la bassa sensibilità del test che può dare una falsa sicurezza sui campioni negativi, per l'elevato costo dovuto al consistente numero di campioni da analizzare e ai tempi di lavoro. Pertanto, per lo svantaggioso rapporto costo/beneficio, lo screening indiscriminato deve essere sostituito da una valutazione clinica del rischio relativo (basso-medio-alto) per TB.

*Sospetto clinico di TB – motivazione terapeutica*

Nel sospetto clinico di TB, la diagnosi di certezza si ottiene con l'isolamento colturale e l'identificazione di MT. Per l'indicazione terapeutica si richiede al dato di laboratorio la massima specificità, non necessariamente una rapidità di risposta. La coltura va sempre condotta sia su terreni solidi come il Lowenstein-Jensen sia su terreni liquidi, poiché non è infrequente ottenere una positività colturale in uno solo dei sistemi. In particolare, i NTM spesso crescono solo in mezzo liquido. A fronte di basse cariche di MT bisogna sempre considerare la possibilità di contaminazioni del campione in fase di raccolta o nelle manipolazioni in laboratorio. L'identificazione corretta richiede l'impiego di sonde di DNA. Questi test di biologia molecolare sono accessibili e praticabili dai laboratori in grado di effettuare correttamente l'esame colturale e sostituiscono metodi di identificazione meno specifici, come il NAP test**.** L'esecuzione contemporanea di un esame batterioscopico eseguito con modalità corretta e di un test per la ricerca di acidi nucleici di MT permette spesso una diagnosi rapida.

*Sospetto clinico di TB contagiosa – esigenza di sanità pubblica*

Per questa indicazione è essenziale la rapidità nello stabilire le caratteristiche di contagiosità del caso, perché da questo risultato originano una serie di iniziative (isolamento del malato, ricerca dei contatti, valutazione degli esposti) che richiedono tempestività di azione. Il ruolo principale è svolto dall'associazione esame batterioscopico - test di amplificazione diretta (DAT) per la ricerca di acidi nucleici di MT, nella attesa di risultati colturali. Un risultato di positività di entrambi i test autorizza la diagnosi di TB, la negatività di entrambi la rende improbabile, una discordanza di risultati impone invio al Laboratorio di ulteriori campioni (4,5).
Disporre nel menù di analisi del Laboratorio della tecnologia DAT e non poterla utilizzare in tempo reale (quotidianamente), ma doverla programmare su cadenza settimanale per esigenze di economia di gestione, la rende inutile a questa indicazione, e il Direttore del Laboratorio deve porsi il quesito se non sia più vantaggioso per la collettività sostituire tale prestazione col rapido invio del campione ad un laboratorio di livello superiore.

*Soggetti a stretto contatto di malati con TB contagiosa*

Le linee guida della Conferenza Stato-Regioni prevedono la ricerca attiva e il controllo dei contatti di un caso di tubercolosi polmonare, per la prevenzione di nuovi casi di tubercolosi nei due anni successivi all'infezione. È richiesto un tempo di segnalazione di caso sospetto di TB contenuto entro tre giorni, e l'avvio della conseguente ricerca attiva dei contatti entro i successivi tre giorni. L'unico contributo richiesto al Laboratorio nell'esame del soggetto individuato come contatto stretto con caso di TB può essere la definizione della reattività alla tubercolina (intradermoreazione secondo Mantoux con 5 UI) e la valutazione di fattori di rischio per una depressione immunitaria quali diabete, alcoolismo, malnutrizione, trattamenti con farmaci immunosoppressori, silicosi, infezione da HIV. La ricerca di anticorpi specifici anti-MT è stata proposta in sostituzione della cutireazione nei soggetti con deficit di immunità cellulare, e quindi anergici. La sierologia per MT ha tuttavia dato esiti deludenti.

*Suscettibilità al trattamento antimicobatterico*

È indicato eseguire una valutazione della sensibilità agli antimicobatterici quando si sospetti una resistenza dei micobatteri isolati. Questa deve essere supposta quando vi è stata una recidiva o un fallimento terapeutico. Nelle linee guida citate le indicazioni prevedono, per questi casi, che la terapia venga iniziata con cinque farmaci: rifampicina (RMP), isoniazide (INH), pirazinamide (PZN), etambutolo (EMB), streptomicina (SM) e, in caso di elevato rischio di multiresistenza o di eventi epidemici da ceppi multifarmacoresistenti (MDR TB), la possibilità di aggiungere un fluorochinolonico e/o cicloserina o PAS. Lo schema terapeutico va individualizzato e reimpostato non appena disponibili i risultati dell'antibiogramma. Nei casi di TB cronica è indicato un ri-trattamento, anche con l'impiego di farmaci di seconda scelta, preceduto da un test di sensibilità farmacologica. Il risultato dell'antibiogramma ha un ruolo fondamentale nella scelta dello schema terapeutico e pertanto il Laboratorio deve garantire esperienza nell'esecuzione dell'esame, accuratezza del dato analitico, e corretta interpretazione dei risultati. La MDR TB è più frequente in immigrati (4.5%) che in italiani (2.3%).

*Monitoraggio del trattamento antimicobatterico - Accertamento cessata infettività*

In corso di trattamento sono previste indagini microbiologiche (esame microscopico e colturale) all'inizio, al primo mese, al secondo mese, alla fine del trattamento. Non può essere omessa, al termine di un trattamento terapeutico, la verifica microbiologica del risultato. Attualmente questo controllo è insufficientemente utilizzato, risultando praticato solo in un quarto dei casi (6).
La ricerca di acidi nucleici di MT non è indicata nella valutazione dell'efficacia del trattamento antimicobatterico. Dopo 15 gg di terapia il soggetto non è più considerato contagioso, tranne nei casi di MDR TB.
Analisi biochimiche per la sorveglianza della epatotossicità e nefrotossicità del trattamento sono richieste al primo mese e successivamente a giudizio del clinico specialista.

*Ammissione in collettività*

Il test intradermico secondo Mantoux rappresenta il test di elezione per lo screening dell'infezione e per questa indicazione non sono applicabili altri esami di laboratorio. È approvato lo screening radiologico del torace su soggetti appartenenti a gruppi a rischio (ovvero con incidenza di malattia superiore a 50/100.000), come gli immigrati. Le linee guida approvano lo screening radiologico del torace anche negli anziani istituzionalizzati, al momento dell'accoglienza nella casa di riposo o nella struttura di lungodegenza e raccomandano, per consentire una tempestiva diagnosi, la sorveglianza dei sintomi suggestivi di malattia tubercolare, in particolare nei soggetti con esiti fibrotici.

*Epidemiologia*

La Medicina di Laboratorio è coinvolta direttamente nella sorveglianza epidemiologica in quanto sorgente tempestiva di informazione, come indicato nelle seguenti linee guida: "È necessario che tutti i casi di tubercolosi vengano tempestivamente segnalati ai Servizi di Igiene Pubblica, in modo da consentire un'efficace ricerca dei contatti. Per migliorare l'esaustività del sistema, sembra opportuno, ove organizzativamente possibile, affiancare alle notifiche di malattie infettive altre fonti informative, quali ad esempio la segnalazione dei micobatteri da parte dei laboratori di microbiologia, come suggerito dall'Organizzazione Mondiale della Sanità".

## Metodologie esecutive dei test diagnostici

Le linee guida sulle procedure analitiche in micobatteriologia, pubblicate anni fa dai Centers for Diseases Control (3), rappresentano tutt'oggi il punto di riferimento per la standardizzazione dei test di laboratorio. In Italia il Comitato AMCLI per lo Studio dei Micobatteri ha prodotto un documento che descrive in dettaglio i metodi analitici in micobatteriologia (2), cui si rimanda; si aggiungono di seguito alcune puntualizzazioni.
La scelta e preparazione del campione dovrebbe essere unica e comune ad esame microscopico, colture, ed eventuale DAT, allo scopo di annullare le variabili legate a differenze di campionatura o di allestimento di preparati diversi provenienti da un singolo campione. L'interpretazione di un DAT, in particolare, non può prescindere dall'esame microscopico condotto su una frazione dello stesso preparato (4).
L'esame batterioscopico deve essere eseguito con metodo in fluorescenza, più sensibile e di lettura facile e rapida.

Per la coltura deve essere utilizzato almeno un terreno solido ed un terreno liquido. L'uso associato di un terreno di coltura liquido e di un terreno di coltura convenzionale solido aumenta in misura rilevante la sensibilità complessiva dell'esame colturale. I tempi di crescita di MT sono più rapidi in brodocoltura quando il campione presenta una carica micobatterica elevata, ma diventano imprevedibili nei campioni batterioscopicamente negativi e nei soggetti in trattamento (7). Inoltre la sensibilità a campioni positivi per MT non è maggiore nei terreni liquidi rispetto ai terreni solidi. Queste osservazioni rendono improponibile l'uso dei soli terreni liquidi come alternativa ai terreni solidi. I terreni liquidi presentano invece sensibilità e tempi di positivizzazione migliori del terreno solido quando il campione contiene NTM. L'interpretazione della significatività colturale è specie dipendente: per MT anche una colonia ha rilevanza diagnostica, quando è ragionevolmente esclusa la possibilità di contaminazione, mentre per NTM, in cui il contagio interumano è inesistente e la trasmissione avviene per aerosol di acque contaminate, la significatività diagnostica si ha con un ripetuto isolamento di almeno 100 CFU nei materiali biologici abitualmente non sterili.
I metodi di biologia molecolare, quali le Sonde di DNA sono indispensabili per l'identificazione di MT e di *Mycobacterium avium-complex*, il più frequente tra i NTM. I metodi di amplificazione diretta sono sensibili e specifici, ma non sufficientemente da rappresentare una scorciatoia che renda superflue microscopia e colture per la diagnosi di TB o la sua esclusione. In particolare il rischio di falsa positività da contaminazione con materiale genetico è presente nei laboratori ad alta prevalenza di campioni positivi e una negatività in presenza di micobatteri documentabili microscopicamente depone per NTM solo se è possibile escludere la presenza di inibitori.

## Bibliografia


1. Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano – Provvedimento 17 dicembre 1998 – Linee-guida per il controllo della malattia tubercolare, su proposta del Ministro della Sanità, ai sensi dell'art. 115, comma 1, lettera b), del decreto legislativo 31 marzo 1998, n. 112. Supplemento ordinario n. 35 alla G.U. n. 40 del 18 febbraio 1999 – Serie generale.
2. Mandler F, Passerini Tosi C, Scarparo C, Tortoli E, Piersimoni C. Comitato AMCLI per lo Studio dei Micobatteri (CoSMic). Proposta di linee-guida per la diagnosi microbiologica della tubercolosi. Microbiologia Medica 1999;14:313-30.
3. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, 1985.
4. Gallina M, Troupioti P, Rocco G, Sensalari G, Libanori E. Predicting culture results for mycobacterium tuberculosis complex. Amplified mycobacterium tuberculosis direct test and acid-fast bacilli microscopy. Chest 2000; 118(1):28-32.
5. Catanzaro A, Davidson BL, Fujiwara PI, et al. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1804-14.
6. Migliori GB, Ambrosetti M, Besozzi G, Farris B, Nutini S, Saini L, et al. National AIPO 'Tuberculosis' Study Group. Microbiological confirmation of tuberculosis cases at diagnosis and at the end of treatment in Italy. Eur J Epidemiol 2000;16(8):719-24.
7. Gallina M, Panaiota T, Libanori E, Senini E. Valutazione comparativa dell'isolamento di micobatteri utilizzando terreno solido Loewenstein-Jensen, sistema radiometrico Bactec 460 TB, terreno liquido MGIT: esperienza di due anni. Microbiologia Medica 2000; 15(3):273-9.