

## **Diversi metodi per una rapida identificazione e differenziamento delle specie di micobatteri a rapida crescita (RGM) in pazienti con Fibrosi Cistica.**

L. Cariani.

Fondazione IRCCS, Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena; Lab Microbiologia, Centro Fibrosi Cistica, Milano.

### **Tassonomia**

Il genere *Mycobacterium* è il solo genere della famiglia *Mycobacteriaceae*. Il contenuto percentuale G+C del DNA delle specie del genere *Mycobacterium* ( 62- 70%) è simile a quello degli altri batteri produttori di acidi micolici, *Nocardia* ( 60- 69%), *Rhodococcus* ( 59-60%), e *Corynebacterium* ( 51- 59%).<sup>1</sup>

Nel 1959 il botanico E. Runyon propose una classificazione che, in base alla velocità di crescita e alla cromogenia, divideva le specie di *mycobacterium* di isolamento umano in 4 gruppi.

Gruppo I specie fotocromogene a lenta crescita

Gruppo II specie scotocromogene a lenta crescita

Gruppo III specie non cromogene a lenta crescita

Gruppo IV specie (pigmentate o non) a rapida crescita (RGM).

*M. chelonae* e *M. abscessus* per la loro velocità di crescita sono classificati nel IV gruppo.

### **Caratteristiche biochimiche**

*M. chelonae* e *M. abscessus* sono micobatteri non responsabili della malattia tubercolare, e appartengono al IV gruppo della classificazione di Runyon ( micobatteri a crescita rapida o RGM ).

Bacilli polimorfi, gram positivi, asporigeni, aerobi obbligati, immobili. Sono batteri microscopicamente lunghi e stretti, o corti e larghi. Il diametro varia da 0,2 a 0,5 µm, la lunghezza da 1 a 6 µm, qualche volta con tendenza alla diramazione (branching). A volte possono essere osservate delle forme coccoidi di circa 0,5 µm.

Le cellule prelevate da giovani colture sono fortemente alcool- acido resistenti, al contrario questa caratteristica svanisce nelle colture vecchie di oltre 5 giorni. Spesso microscopicamente le colonie sono facilmente confuse con *Corinebacterium* spp.

La temperatura di crescita è si colloca tra i 22 e i 40 °C, ( temperatura ottimale di 28°C) ma certi ceppi di *M. chelonae* non sono in grado di crescere a 37° C (Vedi Tab 1)

*M. chelonae* e *M. abscessus* crescono in meno di 5 giorni, sia sui comuni terreni per la crescita dei batteri ( Agar sangue e Agar cioccolato), sia su tutti i migliori terreni di crescita di uso corrente per i micobatteri, compreso il terreno di agar MacConkey senza l'aggiunta di cristal violetto incubato a 28° C.

Le colonie possono essere piccole, lisce e lucide, rugose o piatte, e prive di pigmentazione.

Le caratteristiche fenotipiche che ci permettono di differenziare *Mycobacterium chelonae* dal *Mycobacterium abscessus* sono poche e spesso insufficienti. *Mycobacterium chelonae* non cresce sul terreno agar MacConkey incubato a 37°C, non cresce in presenza del 5% di NaCl a 35° C, mentre questa assimila il citrato.

Dei risultati opposti sono ottenuti per il *Mycobacterium abscessus*.

**Tabella 1: Caratteristiche differenziali dei diversi micobatteri a crescita rapida (RGM)**

Caratteristiche	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura ottimale di crescita (° C)	28	28	28	28	28	28	28	28
Crescita in terreno MacConkey a 37°C	+	-	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Morfologia delle colonie	Liscie o rugose	Liscie o rugose	Liscie o rugose	Liscie o rugose	NV	NV	NV	NV
Arylsulfatase ( 3 giorni)	+	+	+	+	+	+	d	+
Riduzione nitrati	-	-	+	+	+	-	d	+
Imbrunimento delle colonie in presenza di citrato- ferrico	-	-	+	+	+	-	-	+
Mannitolo***	-	-	-	-	+	-	+	+
Inositolo***	-	-	-	-	+	-	-	-
Citrato***	-	+	-	-	d	-	d	-
D-glucitolo***	-	-	-	-	+/-	-	-	-
NaCl a 35° C	+	-	+	-	+	-	-	+
Catalasi semiquantitativa****	+	+	+	+	d		d	

1)*M. abscessus*, 2)*M. chelonae*, 3)*M. fortuitum subsp fortuitum*, 4)*M. fortuitum subsp acetamidolyticum*, 5)*M. fortuitum subsp biovariant trois*, 6) *M.immunogenum*,7) *M. mucogenicum*, 8) *M. peregrinum*

+: il 90% dei ceppi risultano positivi al test

-: il 90% dei ceppi risultano negativi al test

d: tra 11 e 89% dei ceppi risultano positivi al test

\*\*\*: Assimilazione

\*\*\*\*: formazione di bolle dall'altezza superiore ai 45 mm

NV: non valutato

## Habitat

*M. abscessus* e *M. chelonae* sono dei microrganismi ampiamente distribuiti nell'ambiente in particolare nell'acqua (dei fiumi, dei laghi, del mare e delle fognature) e nel suolo.

In Norvegia, in Svezia e in Germania, *M. chelonae* è frequentemente isolato negli stagni ed è probabile che anche *M. abscessus* possa essere isolato da tali luoghi.

*M. chelonae* e *M. abscessus* resistono meglio al cloro dei batteri coliformi: sono stati isolati nelle fontanelle di acqua potabile, frequentemente isolati nel sistema di purificazione dell'acqua potabile di utilizzo domestico. Queste caratteristiche ci permettono di capire che queste specie batteriche possono sopravvivere e moltiplicarsi nelle reti idriche<sup>2</sup>.

*M. chelonae* e *M. abscessus* possono resistere ai disinfettanti come la glutaraldeide al 2 % o al cloroformio al 8%. Conferendo loro una maggior capacità di contaminare materiale medico, materiale chirurgico, materiale utilizzato per il "percung", antisettici, reattivi di laboratorio (es: soluzioni di cristal violetto) e acqua distillata.

## Potere patogeno nell'uomo

### *M. chelonae*

*M. chelonae* è la specie appartenente al gruppo degli RGM più resistente ai diversi chemioantibiotici. E' coinvolto in diverse infezioni acquisite in comunità.

Le infezioni acquisite in comunità possono essere suddivise in tre gruppi:

- **Malattia polmonare;** *M. chelonae* causa molto raramente malattie polmonari croniche. In uno studio di 154 pazienti con malattia polmonare cronica causata da RGM, solo 1 dei 154 isolati fu identificato come specie *M. chelonae*.

- **Malattie disseminate:** *M. chelonae* causa tre tipi di malattie cutanee. La malattia più comune è la malattia cutanea disseminata in pazienti immunodepressi, soprattutto vengono colpiti i pazienti sottoposti a trattamenti con farmaci steroidei e chemioterapici (es: pazienti trapiantati d'organo, con artrite reumatoide e altre malattie autoimmuni).

Infezioni da *M. chelonae* sono presenti anche in pazienti con immunosoppressione indotta da farmaci, al contrario pazienti con AIDS non sono a rischio di contrarre l'infezione.

- **Infezioni localizzate:** Un terzo tipo di infezioni causate da *M. chelonae*, sono quelle acquisite in seguito a traumi (es: celluliti, ascessi e osteomieliti).

Un altro gruppo di patologie associate a *M. chelonae* sono quelle associate alle procedure invasive.

Molto sporadicamente sono stati isolati ceppi di *M. chelonae* in ferite infette dopo procedure chirurgiche.

(es: agoaspirati, impianti di valvole cardiache contaminate, siringhe contaminate).

Altre infezioni causate da *M. chelonae* sono quelle correlate all'utilizzo di cateteri endovenosi infetti (batteriemie), infezioni dei tessuti molli, infezioni articolari, endocarditi provocate da protesi valvolari contaminate, infezioni delle cornee o per dialisi peritoneale.

Infezioni disseminate sono state osservate in soggetti debilitati, infezioni cutanee disseminate sono state osservate in pazienti con insufficienza renale o in pazienti che hanno effettuato un trapianto di rene, infezioni generalizzate a numerosi organi in pazienti immunodepressi.

Negli U.S.A l'iniezione di una soluzione iniettabile contaminata da *M. chelonae* ha provocato la formazione di ascessi in 87 pazienti in un periodo compreso tra il gennaio 1995 e il mese d'agosto 1996.

In Colombia, la formazione di ascessi in 350 pazienti sono stati attribuiti ad iniezioni di lidocaina contaminate da *M. chelonae*.

La contaminazione dei reattivi e/o dell'acqua distillata in laboratorio può essere l'origine di pseudo infezioni per contaminazione di più prelievi.

### ***M. abscessus***

Degli RGM patogeni *M. abscessus*<sup>9</sup> e *M. chelonae* sono probabilmente le specie più resistenti agli antibiotici. Come *M. chelone*, il *M. abscessus* è coinvolto in una varietà di differenti tipi di infezioni acquisite in comunità. *M. abscessus* è ritenuto il maggior responsabile delle patologie polmonari acquisite in comunità.

Le malattie polmonari, da *M. abscessus* includono: bronchiectasie in pazienti con Fibrosi Cistica e malattie granulomatose (sarcooidosi o tubercolosi)

Secondo l'analisi di Griffith et al.<sup>3</sup> la malattia polmonare da *M. abscessus* è molto simile alla malattia polmonare da *M. avium* complex, del tipo conosciuto come bronchiectasia nodulare. Il secondo presenta un decorso lento e colpisce prevalentemente pazienti anziani di sesso femminile non fumatrici e mostra una possibile disposizione geografica.

Queste similitudini suggeriscono una patogenicità comune o una suscettibilità dell'ospite.

Ripetuti isolamenti di *M. abscessus* dal tratto respiratorio sono usualmente associati a malattia polmonare significativa.

- **Malattia polmonare in pazienti con FC.** Molti AA hanno notato che la frequenza di ritrovamento di *M. abscessus* nel tratto respiratorio di pazienti con FC è molto maggiore che in altri pazienti. I pazienti con FC infatti sono predisposti alle infezioni delle vie aeree e parenchimali per diversi motivi come la natura della malattia e le abituali bronchiectasie associate<sup>4</sup>(probabilmente, il primo fattore di rischio). L'isolamento di altri microrganismi, quali *P. aeruginosa*, spesso mascherano l'isolamento degli RGM e l'interpretazione del loro significato clinico. Dopo *M. avium* complex, *M. abscessus* è la seconda specie più comune di micobatteri isolata dal tratto respiratorio di pazienti con FC<sup>5</sup>.

Inoltre nei pazienti FC che hanno subito un trapianto polmonare la terapia immunosoppressiva post trapianto aumenta il rischio di sviluppare un'infezione da micobatteri non tubercolari, con conseguente

sviluppo di malattia polmonare da *M. abscessus*, e infezioni disseminate, quali ad esempio adeniti cervicali.

- **Malattie extrapolmonari.** Dopo *M. fortuitum*, *M. abscessus* è la specie più comune fra gli RGM ad essere isolato da campioni biologici. E' causa anche di una gran varietà di malattie extrapolmonari, ad esempio infezioni cutanee disseminate, cheratiti.
- **Malattie associate a manovre invasive.** *M. fortuitum* e *M. abscessus* sono le specie più comuni di micobatteri che causano malattie nosocomiali, associate soprattutto a infezioni di ferite chirurgiche che rappresentano il 43% dei casi clinici delle infezioni extra polmonari dovute a queste specie.

## **Indagini microbiologiche per la ricerca di *M. abscessus* e *M. chelonae* nell'espettorato di pz FC**

L'escreato va raccolto preferibilmente il mattino, o comunque a distanza dal pasto, dopo accurata pulizia con gargarismi e sciacqui del cavo orale con acqua di fonte o soluzione fisiologica.

- **Trasporto e conservazione del campione.**

Il periodo che intercorre tra la raccolta del materiale e la semina dello stesso deve essere il più breve possibile (30-60 minuti al massimo); se ciò non fosse possibile i campioni dovranno essere conservati in frigorifero a 4°C fino al momento della semina, che non dovrà però essere eseguita oltre 6-8 ore dal momento del prelievo del campione.

- **Fluidificazione e omogeneizzazione del campione**

E' necessario rendere fluido il nummulo perché molto viscoso e poco solubile; considerata inoltre l'eterogeneità della flora batterica e la sua inomogeneità l'escreato va omogeneizzato. Allo scopo si impiegano prodotti in grado di lasciare inalterata la vitalità dei microrganismi.

Si potrebbero utilizzare vari tipi di sostanze fluidificanti, sono però da preferire i composti attivi sui ponti S-S delle catene polipeptidiche: tali sostanze operano una riduzione specifica e stabile dei ponti disolfuro, come il Ditiotreitolo alla concentrazione ottimale dello 0,1% in PBS pH 7,2. E' importante la sterilizzazione per filtrazione del riducente prima dell'uso. A tale scopo si usano filtri Millipore 0,45µ. E' possibile comunque reperire in commercio il Ditiotreitolo in confezioni sterili (Sputasol).

- **Semina del campione su terreno selettivo BCSA**

Il BCSA è un terreno selettivo per la crescita di *Burkholderia cepacia* complex<sup>6</sup> particolarmente efficace nell'inibire la crescita di *P. aeruginosa* ( in particolare il fenotipo mucide), molto invasivo che facilmente copre e maschera la crescita di altri microrganismi. Tuttavia la selettività del terreno non impedisce la crescita di altri microrganismi: Micobatteri a rapida crescita, *A. xylosoxidans*, *Flavobacterium* spp e *Aspergillus* spp.

Questa parziale selettività del terreno ci ha permesso di evidenziare la crescita degli RGM dopo un periodo di incubazione di 7/ 15 gg, a temperatura ambiente.

Le colonie sempre piccole e prive di pigmentazione possono presentare diverso aspetto: lisce e lucide o rugose.

#### Composizione del terreno BCSA

<b>Agar</b>
1% lattosio
1% saccarosio
Estratto di lievito
600 U/ ml polimixina B
10 µg/ml gentamicina
2,5 µg/ml vancomicina

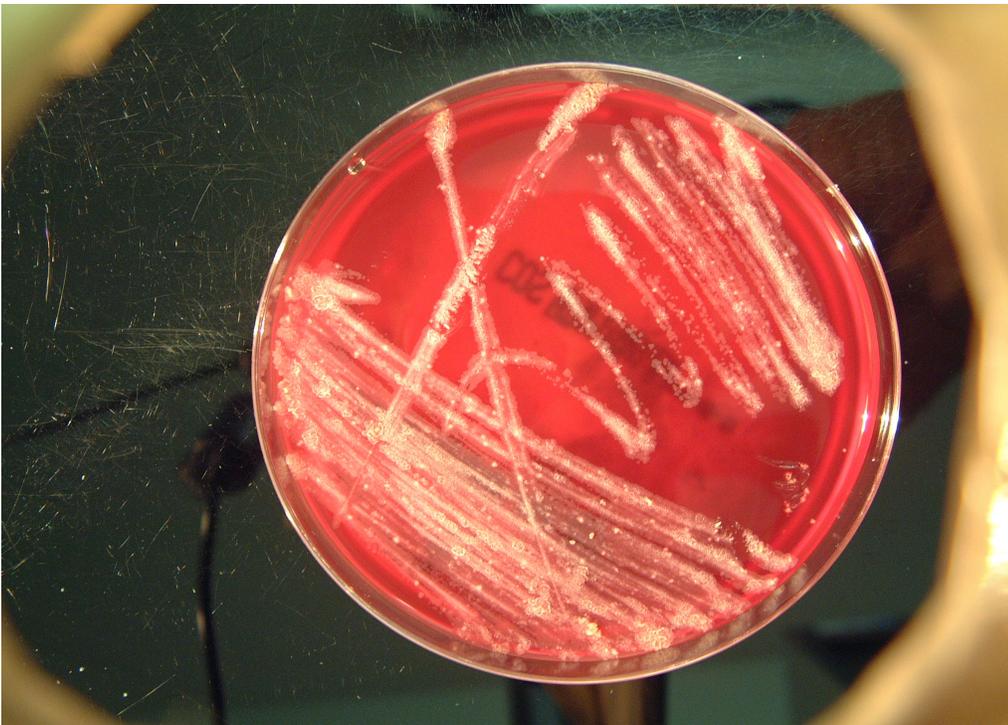
#### Procedura:

- Seminare 0,1 ml del campione precedentemente fluidificato ( rapporto 1: 1) utilizzando pipette sterili in plastica monouso.
- Distribuire omogeneamente il materiale su tutta la superficie della piastra utilizzando una spatola di vetro opportunamente sterilizzata con alcool e passata alla fiamma, o con un'ansa calibrata sterile monouso.
- Incubare a 35°C per 48 ore in atmosfera aerobia e successivamente porre le piastre a temperatura ambiente per altri 5 /15 gg.
- Nel caso di positività per RGM le colonie appaiono piccole non pigmentate, mucose o rugose biancastre dal caratteristico odore di “ cantina-muffa”
- Riseminare su agar sangue tutte le colonie sospette per la successiva identificazione mediante tecniche di biologia molecolare e per la valutazione dei test di sensibilità agli antibiotici.

**Foto 1: Colonie di *M. abscessus* / *M. chelonae* su BCSA agar**



**Foto 2: Subcolture di colonie rugose su Agar sangue**



**Foto 3: Subcolture di colonie lisce su Agar sangue**



### **Valutazione in vitro della sensibilità ai diversi chemioantibiotici**

Anche se esistono delle raccomandazioni dell'NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), non abbiamo per ora metodi standardizzati e universalmente riconosciuti per la valutazione in vitro della sensibilità agli antibiotici di *M. chelonae* e *M. abscessus*

La tecnica della microdiluizione è spesso raccomandata e sembra dia dei risultati migliori rispetto al sistema E-test.

I ceppi di *M. chelonae* e *M. abscessus* sono caratterizzati dall'aver una multiresistenza agli antibiotici.

Inoltre sono state osservate anche delle resistenze acquisite attraverso mutazioni nei confronti di amikacina e claritromicina.

I ceppi sono resistenti alla pefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina, sulfametossazolo e alle doxycycline, ma generalmente sono sensibili alla claritromicina alla azitromicina e all'imipenem. La sensibilità a linezolid è variabile a seconda del ceppo batterico, sembra inoltre che *M. abscessus* sia più resistente a queste molecole di *M. chelonae*<sup>7</sup>.

I ceppi di *M. abscessus* sono generalmente sensibili all'amikacina e alle cefoxitine, mentre i ceppi di *M. chelonae* sono generalmente resistenti.

Al contrario i ceppi di *M. chelonae* sono generalmente sensibili alla tobramicina, mentre *M. abscessus* è resistente a questo antibiotico.

La claritromicina e la tigecyclina sono gli antibiotici più attivi e utilizzati.

Le prove di sensibilità in vitro si fondano sulla dimostrazione della attività inibente svolta dall'antibiotico sul microrganismo in terreno di coltura idoneo.

## Test di sensibilità per micobatteri a rapida crescita (RGM)

Sono state descritte più di 30 specie di micobatteri a rapida crescita, ma solo tre di queste, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium abscessus*, sono, con una certa frequenza, responsabili di infezioni nell'uomo. Questi micobatteri sono resistenti alla maggior parte dei farmaci antitubercolari, mentre possono essere sensibili ad alcuni farmaci non comunemente usati nei laboratori di micobatteriologia. L'approccio da usare per il saggio di sensibilità e l'interpretazione dei risultati, sono più simili a quelli relativi agli altri batteri aerobi che non a quelli relativi ai micobatteri a lenta crescita.

Per i test di sensibilità dei micobatteri a rapida crescita sono stati descritti quattro metodi: agar diluizione, agar diffusione, microdiluizione in brodo ed E-test; nessuno di questi metodi è stato tuttavia approvato dal NCCLS. Per la semplicità di esecuzione e per la buona correlazione con i metodi convenzionali il metodo E-test, che tuttavia necessita di ulteriori valutazioni, può trovare un facile inserimento nel laboratorio di microbiologia.

Tabella 3: Criteri interpretativi dei valori di MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )

FARMACO	SENSIBILI	MODERATAMENTE SENSIBILI	RESISTENTE
Amikacina	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Tetraciclina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Claritromicina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Ciprofloxacina	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Levofloxacina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Imipenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Meropenem	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Trimetoprim-sulfametossazolo	$\leq 2/32$	-	$\geq 4/64$
Azitromicina	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$
Linezolid	$\leq 8$	16	$> 32$
Tobramicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Tigeciclina	$\leq 2$		

### Principio

E-test è un metodo quantitativo per la determinazione della sensibilità ai farmaci consistente in una sottile striscia di plastica inerte e non porosa che presenta su una faccia una scala di lettura graduata mentre sull'altra faccia è immobilizzato, in un gradiente esponenziale predefinito, il farmaco essiccato e stabilizzato.

Quando la striscia E-test viene applicata sulla superficie inoculata di una piastra, il passaggio del farmaco dal supporto di plastica alla matrice agarizzata è immediato e un gradiente esponenziale continuo del farmaco si forma direttamente sotto la striscia di supporto.

Dopo l'incubazione, quando la crescita micobatterica si rende visibile, si può osservare un alone di inibizione ellittico, centrato lungo la striscia di plastica. Il valore di MIC, espresso in µg/ml, viene letto nel punto di intersezione tra il bordo dell'ellisse di inibizione e la striscia di E-test.

### **Reagenti**

- Strisce di E-test (AB-Biodisk) con i diversi farmaci
- Piastre di 7 H 11 Agar (AB-Biodisk): terreno per le prove di sensibilità dei micobatteri

### **Procedimento**

- Trasferire, con un'ansa sterile, 1 o 2 colonie in una provetta con tappo a vite contenente acqua distillata sterile, ed omogeneizzare al vortex.
- Misurare la torpidità della sospensione che deve risultare di 0,5 McFarland.
- Inoculare uniformemente la superficie della piastra di 7 H 11 Agar con la sospensione batterica, usando un tampone di cotone sterile.
- Applicare le strisce E-test ed incubare le piastre in aerobiosi a 35°C per tre giorni in giare umidificate.
- Interpretare le MIC in base alle indicazioni della tabella 5.
- Refertare le MIC e le relative interpretazioni.

### **Controllo di qualità**

Il *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841) può essere utilizzato per verificare l'attività dei diversi farmaci ad eccezione della claritromicina per la quale si è dimostrato più attendibile il *Mycobacterium chelonae* (ATCC 14472).

## Tecniche di biologia molecolare

Diversi metodi basati sull'amplificazione PCR di specifiche porzioni di genoma batterico sono stati proposti per il rilevamento e l'identificazione (o differenziazione) di specie di micobatteri.

Questi metodi si differenziano essenzialmente per il tipo di tecnica utilizzata per l'analisi del frammento amplificato.

Le principali tecniche di biologia molecolare utilizzate sono:

- PRA ( PCR Restriction Analysis)
- Genotype® Mycobacterium CM (ibridazione con sonde specifiche adese ad una membrana)
- Sequenziamento del gene 16 S rRNA.
- INNO LiPA Mycobacteria (Innogenetics, Ghent, Belgium)

Nel nostro laboratorio l'identificazione degli NTM ( Micobatteri non tubercolari) viene eseguita mediante le tecniche PRA e Genotype® Mycobacterium CM.

In un caso, all'amplificazione segue un'analisi di restrizione (PRA), nell'altro una ibridazione con sonde specifiche. L'analisi di restrizione è più complessa e poco costosa ed è preferibile come tecnica "home made". L'ibridazione con sonde specifiche è più semplice ma costosa e si presta meglio ad essere utilizzata per le metodiche commerciali confezionate (kit). L'analisi di restrizione è stata applicata a diverse porzioni di geni altamente conservati come *hsp65* e *rpoB* o il 16 S rDNA per la rapida differenziazione di isolati clinici strettamente correlati come *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. chelonae* e *M. abscessus*.

### PRA

Per identificare i sospetti micobatteri RGM isolati sul BCSA è stata scelta una porzione di 342 bp della sequenza del gene codificante per la subunità  $\beta$  della RNA polimerasi (*rpoB*). Tale gene è infatti descritto in letteratura essere in grado di differenziare il gruppo dei micobatteri tubercolari da quello dei non tubercolari (NTM) e dei micobatteri a lenta crescita da quello dei micobatteri a rapida crescita.

Il prodotto di amplificazione è stato analizzato mediante l'uso dei seguenti enzimi di restrizione: *Hind II*, *Mva I*, *AccII*, *HaeIII*. ( Vedi schema successivo).

Preliminarmente l'analisi di restrizione con *Hind II* è necessaria per discriminare i micobatteri tubercolari da quelli NTM. I micobatteri a rapida crescita sono stati differenziati da quelli a lenta crescita mediante il analisi del profilo di restrizione ottenuto utilizzando l'enzima *HaeIII*.

- *HaeIII* taglia specificatamente la sequenza di *rpoB* amplificata originando dei frammenti di DNA che, nel caso dei micobatteri a rapida crescita, comprendono frammenti lunghi 61 bp o di 201 bp (o entrambi).
- *Acc II* viene utilizzato per discriminare *M. abscessus* (207bp, 79bp) da *M. fallax* (137 bp, 79bp).
- *Mva I* identifica definitivamente *M. chelonae* nel cui amplificato non trova siti di restrizione (342 bp).

Come controllo, è stato utilizzato un ceppo di *M. smegmatis* della collezione dell'Istituto di Microbiologia dell'Università di Milano.

### **Estrazione del DNA**

Il test non può essere impiegato per rilevare i micobatteri direttamente dal campione biologico, si utilizzano come campioni di partenza le colonie batteriche cresciute su terreno solido (es: Agar Sangue oppure Lowenstein-Jensen).

1. Raccogliere i batteri con un'ansa e risospenderli in 300µl di acqua sterile.
2. Incubare la sospensione a 95°C in blocco termico o bagno termostato.
3. Incubare per 15 minuti in un bagno ultrasonico.
4. Centrifugare la sospensione per 5 minuti a 5000-6000 x g (7500-8000 rpm) e utilizzare direttamente 5 µl del surnatante per la PCR.

Nel caso non sia possibile processare subito il campione trasferire il surnatante in una provetta, e conservarlo a - 20°C.

### **Amplificazione**

Preparare la mix di amplificazione

Per ogni campione miscelare:

- 2.5 mM di soluzione MgCl<sub>2</sub> .
- 50 mM KCl
- 10 mM Tris HCl (pH 8,3)
- 20 pmol primers (Forward e Reverse)
- 250 µM per ogni dNTP
- 1-2 Unità di Taq polymerase termostabile
- x µl di acqua sterile per biologia molecolare. La quantità aggiunta deve portare ad un volume finale della mix di 50 µl.
- Aggiungere 5-10 µl di soluzione di DNA (50 ng) estratto.

NB: le concentrazioni dei buffer possono variare molto a seconda della DNA polimerasi utilizzata.

**Protocollo di amplificazione:**

95° C per 5 min - 1 ciclo (variabile a seconda della polimerasi utilizzata)

95° C per 45 sec

60° C per 30 sec - 35 cicli

72° C per 45 sec

72° C per 8 min - 1 ciclo

Controllare la dimensione del materiale amplificato su gel di agarosio al 2,5 % usando un marcatore di peso molecolare (DNA ladder) con scala da 50 bp.

Al termine proseguire immediatamente con la fase di digestione (condizioni d'uso in relazione alle istruzioni riportate dalla ditta fornitrice) o conservare gli amplificati a 4° C o a -20° C.

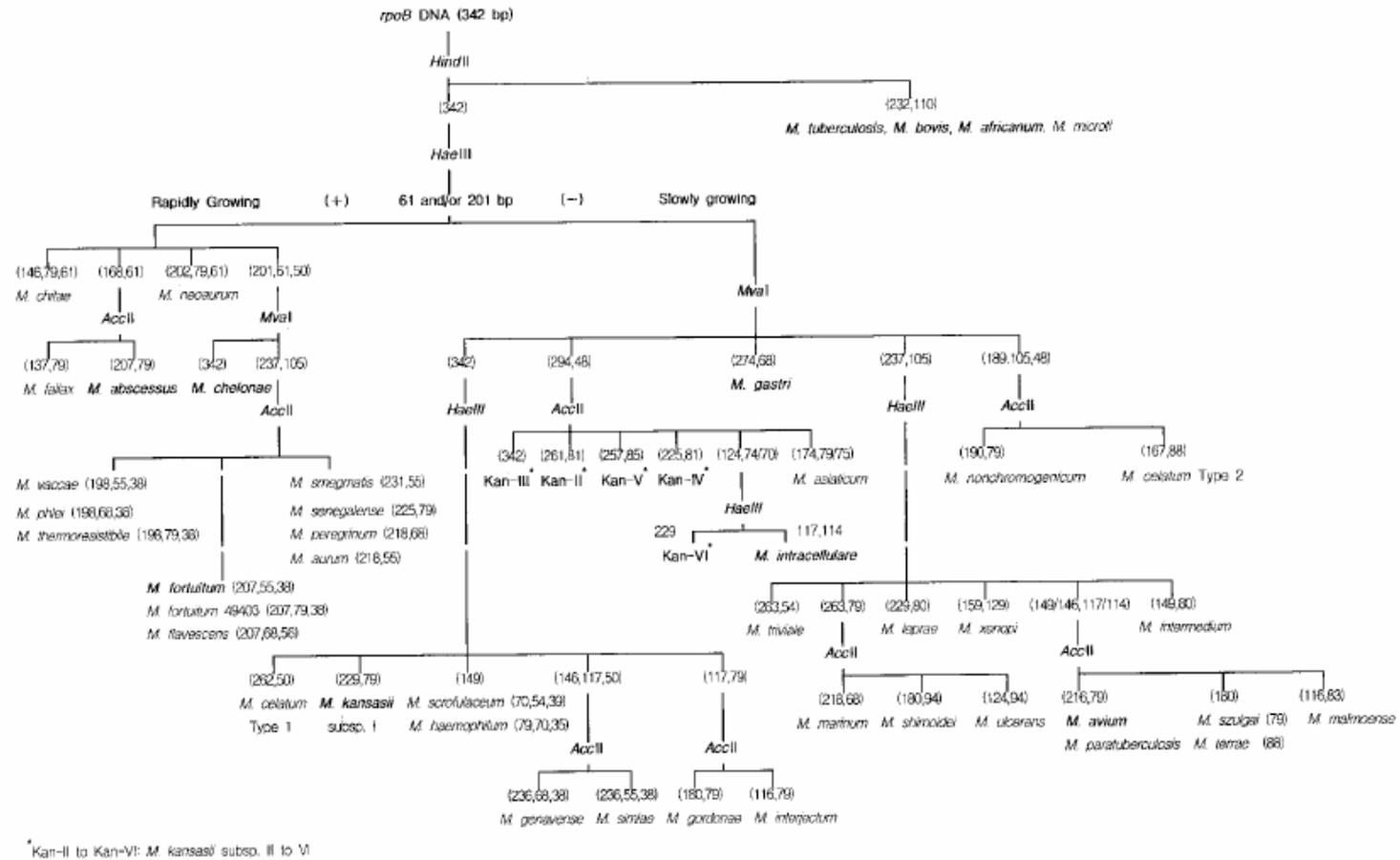
Verificare l'avvenuta digestione mediante elettroforesi su gel di agarosio al 4% , corsa a 100V per ≈25 min.

Utilizzare un DNA-ladder da 25bp come marcatore di peso molecolare.

Per ulteriori dettagli riguardanti la sequenza dei primers e le condizioni di digestione fare riferimento agli articoli:

- "Differentiation of Mycobacterial Species by PCR-Restriction Analysis of DNA (342 Base Pairs) of the RNA Polymerase Gene (rpoB)" Bum-Joon Kim, et al., *J. Clin. Microbiol*, June 2001, p. 2102–2109.
- "Comparative Evaluation of Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis: Two Amplified Targets, hsp65 and rpoB, for the Identification of Cultured Mycobacteria". W. Cheunoy et al, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005, 165-171.

Schema interpretativo per l'identificazione dei micobatteri mediante PRA utilizzando gli enzimi di restrizione *HaeIII*, *HindIII*, *MvaI*, and *AccII*



Bum-Joon Kim, et al., *J. Clin. Microbiol.*, June 2001, p. 2102–2109.

## Genotype<sup>®</sup> Mycobacterium CM

L'analisi genetica molecolare per l'identificazione della specie di micobatteri si basa sull'ibridazione della sequenza intergenica 16 S - 23 S amplificata mediante PCR con 15 sonde specifiche fissate su una membrana.

Le sonde specifiche permettono l'identificazione delle seguenti specie di micobatteri<sup>8</sup>.

*M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. tuberculosis complex* e *M. xenopi*, *M. interjectum*.

L'intera procedura può essere suddivisa in tre fasi successive:

- estrazione del DNA da colonie batteriche ( i reattivi necessari non sono forniti)
- amplificazione mediante primers biotinilati
- rivelazione mediante Reverse Hybridization.

Quest'ultima fase prevede tre passaggi successivi: la denaturazione chimica dei prodotti amplificati, l'ibridazione degli ampliconi biotinilati a singola elica con le sonde specifiche adese ad una membrana, un lavaggio stringente, l'aggiunta di un coniugato streptavidina/fosfatasi alcalina e infine di un substrato enzimatico cromogeno specifico per la fosfatasi alcalina.

Una striscia di riferimento fornita nel kit permette la facile e rapida interpretazione dei pattern di bande ottenute.

### Estrazione del DNA

Vedi pag 12

### Amplificazione

Preparare la mix di amplificazione (45 µl per ogni campione).

Per ogni campione miscelare:

- 35 µl di mix di Primers e nucleotidi (PNM).
- 1-2 Unità di Taq polymerase termostabile (consigliata Hot Start Taq Polymerase, Quiagen. Non fornita nel kit).
- 5 µl di tampone specifico per la Taq, concentrato 10 X (non fornito).
- x µl di soluzione MgCl<sub>2</sub> (non fornito).
- y µl di acqua sterile per biologia molecolare. La quantità aggiunta deve portare ad un volume finale della mix di 45 µl.
- Aggiungere 5 µl di soluzione di DNA estratto fino ad un volume finale di 50 µl.

Per il controllo negativo aggiungere, 5 µl di acqua sterile invece della soluzione di DNA.

### **Protocollo di amplificazione:**

95° C per 5 min - 1 ciclo

95° C per 30 sec  
58° C per 2 min - 10 cicli

95° C per 25 sec  
53° C per 40 sec - 20 cicli  
70° C per 40 sec

70° C per 8 min - 1 ciclo

E' possibile verificare l'avvenuta reazione di amplificazione mediante elettroforesi dei campioni su gel di agarosio al 2%. La lunghezza dell'amplificato è di circa 200 bp.

Al termine proseguire immediatamente con la fase di rivelazione o conservare gli amplificati a 4° C o a -20° C.

### **Rivelazione mediante Reverse Hybridization**

Preriscaldare a 45° il bagno termostato dotato di agitatore; il massimo scarto tollerato è di  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

Preriscaldare prima dell'uso la soluzione di ibridazione (HYB) e la soluzione di lavaggio stringente (STR) a 37-45°C. I reattivi al momento dell'uso devono essere privi di precipitati, eventualmente miscelarli bene. Portare tutti gli altri reattivi a temperatura ambiente, ad eccezione del coniugato concentrato (CON-C) e del substrato concentrato (SUB-C). Diluire 1:100 il coniugato concentrato (CON-C) e il substrato cromogeno concentrato (SUB-C) nei rispettivi tamponi di diluizione (CON-D e SUB-D) in base ai volumi richiesti. Miscelare bene e portare a temperatura ambiente. Calcolare 1 ml di reagente diluito per ogni striscia da testare, quindi diluire 10  $\mu\text{l}$  di reagente concentrato in 1 ml di tampone.

1. Dispensare 20  $\mu\text{l}$  di soluzione di denaturazione (DEN) nell'angolo della vaschetta previsto per il test.
2. Aggiungere 20  $\mu\text{l}$  di campione amplificato, miscelare bene col puntale e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Nel frattempo estrarre con una pinzetta le strisce e numerarle con una matita al di sotto della linea apposita.
3. Aggiungere 1 ml di Tampone di ibridazione (HYB) pre- riscaldato in ogni canale utilizzato. Agitare la vaschetta fino a rendere la soluzione omogeneamente colorata.
4. Con le pinzette porre le strisce nei canali da utilizzare. Le strip devono essere completamente immerse nella soluzione e con il lato su cui sono adese le sonde rivolto verso l'alto.
5. Porre la vaschetta su un agitatore all'interno di un bagno termostato e incubare per 30 m a 45° C. Regolare in modo appropriato la frequenza dell'agitatore per miscelare la soluzione in modo completo e costante.
6. Aspirare ed eliminare completamente il Tampone di ibridazione.

7. Aggiungere 1 ml di soluzione di lavaggio stringente (ST) ad ogni striscia e incubare per 15 minuti a 45° C sull'agitatore nel bagno termostato.
8. Eliminare completamente il Tampone di lavaggio stringente prime rovesciando la vaschetta in un contenitore per i rifiuti e poi battendola gentilmente su carta assorbente. Questo procedimento si applica ad ogni fase di lavaggio.
9. Lavare ogni strip con 1 ml di soluzione di risciacquo (RIN) per 1 minuto su un agitatore a temperatura ambiente. Eliminare poi la soluzione rovesciando la vaschetta.
10. Aggiungere 1 ml di coniugato diluito ad ogni strip e incubare per 30 minuti su un agitatore a temperatura ambiente.
11. Rimuovere completamente il coniugato e lavare le strip due volte per 1 minuto con 1 ml di soluzione di Risciacquo (RIN) e una volta per 1 minuto con 1 ml di acqua distillata su un agitatore a temperatura ambiente. Eliminare ogni volta il liquido rovesciando la vaschetta.
12. Aggiungere 1 ml di substrato cromogeno diluito ad ogni strip e incubare al buio senza agitare. Il tempo di incubazione può variare da 3 a 20 minuti in funzione delle condizioni ambientali.
13. Fermare la reazione lavando brevemente con acqua distillata per due volte.
14. Utilizzando le pinzette rimuovere le strip dalla vaschetta e lasciarle asciugare fra due strati di carta assorbente.

### **Valutazione e interpretazione dei risultati**

Incollare le strip sulla scheda di valutazione apposita fornita nel kit, le bande del coniugato (CC) e controllo universale ( UC) con quelle di riferimento riportate sulla scheda stessa. Segnalare nella penultima colonna della scheda le bande positive di ogni campione e indicare nell'ultima colonna il nome della specie determinata con l'aiuto dello schema interpretativo allegato. Anche la strip di riferimento fornita nel kit serve come aiuto per la valutazione e deve essere allineata sulla scheda come le strisce dei campioni. Conservare le strip al buio.

Ogni strip possiede 17 zone reattive, evidenziabili come bande.

### **Controllo del coniugato ( CC)**

Lo sviluppo di questa banda sulla strip conferma l'efficacia del legame dl coniugato e della reazione cromogena.

### **Controllo universale (UC)**

Questa banda è specifica per tutti i micobatteri noti e per il gruppo di batteri Gram positivi con un elevato contenuto di G+C nel Genoma.

Se si osserva la comparsa di questa banda e di quella del coniugato, ma il profilo della striscia non è correlabile a nessuna delle specie indicate, sono necessari metodi addizionali o alternativi per identificare la specie in oggetto.

Solo le bande che hanno intensità uguale o superiore a quella del Controllo universale devono essere prese in considerazione per l'identificazione della specie.

### Controllo del Genere(GC)

La comparsa di questa banda documenta la presenza di un membro appartenente al genere *Mycobacterium*

### Bande 4-17

Bande specifiche per l'identificazione della specie (vedi schema interpretativo).

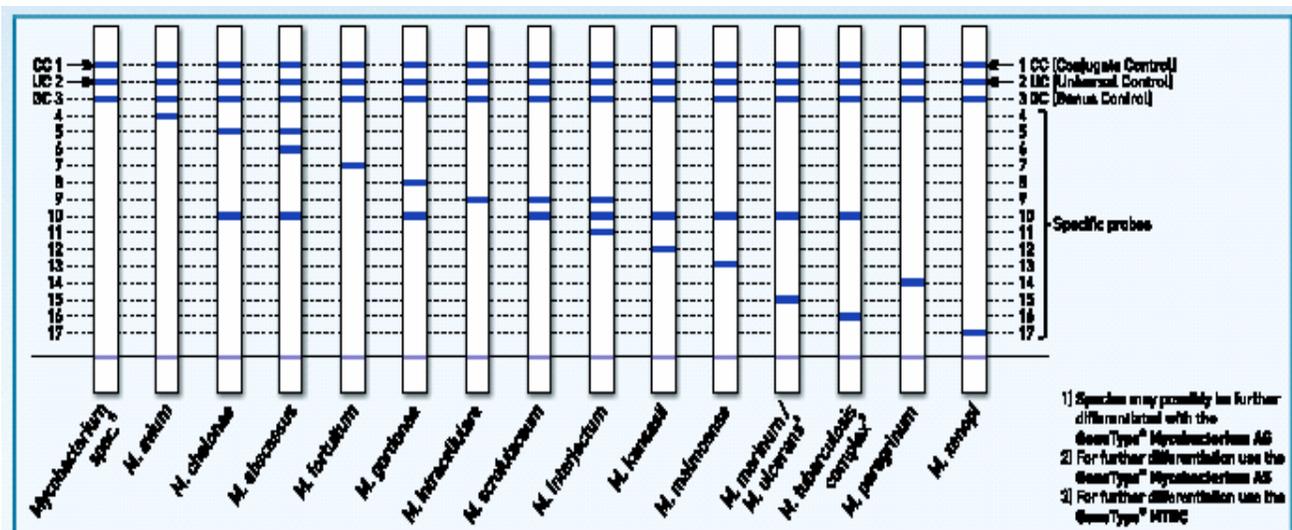


Fig. 1: Reaction zones of GenoType<sup>®</sup> Mycobacterium CM

## SEQUENZIAMENTO DEL GENE 16 S rRNA

Vedere articoli di riferimento:

- Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species. Cristina Russo, Enrico Tortoli et al, *J Clin Microbiol*, 2006, 334-339.
- PCR Assay Based on DNA Coding for 16 S rRNA for Detection and Identification of Mycobacteria in Clinical Sample. L.F.F. Kox et al, , *J Clin Microbiol*, 1995, 3225-3233

### **INNO LiPA Mycobacteria** , (Innogenetics, Ghent, Belgium)

- Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. Elvira Richter, et al. *J Clin Microbiol*, 2006, 1769-1775.

### **Bibliografia:**

- <sup>1</sup>.Bojalil, L. F., and J. Cerbón. 1961. Taxonomic analysis of nonpigmented, rapidly growing mycobacteria. *J Bacteriol*. 81:338-345.
- <sup>2</sup>.Fisheder (R.), Schulze-Röbbecke (R.) Et Weber (A.) : Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zbl. Hyg.*, 1991, 192, 154-148.
- <sup>3</sup>. Griffith, D. E., W. M. Girard, and R. J. Wallace, Jr. 1993. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: analysis of 154 patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147:1271-1278.
- <sup>4</sup>.Fauroux, B., B. Delaisi, A. Clément, C. Saizou, D. Moissenet, C. Truffot- Pernot, G. Tournier, and H. Vu Thien. 1997. Mycobacterial lung disease in cystic fibrosis: a prospective study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16:354-358.
- <sup>5</sup>. Sanguinetti, M., F. Ardito, E. Fiscarelli, M. La Sorda, P. D'Argenio, G. Ricciotti, and G. Fadda. 2001. Fatal pulmonary infection due to multidrug- resistant *Mycobacterium abscessus* in a patient with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 39:816-819.
- <sup>6</sup>. Henry, D., Campbell. M. et al....*Journal of Clinical Microbiology*, Apr 1999, pg 1004-1007.
- <sup>7</sup>. Wallace. R.J., Wilson. R.W et al.... Activities of Linezolid against Rapidly Growing Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Mar. 2001, 764-767.
- <sup>8</sup>. Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Cristina Russo, Enrico Tortoli, et al. . *J. Clin. Microbiol* 2006: 334-339.
- <sup>9</sup>. Mycobacterium abscessus: an emerging rapid – growing potential pathogen. B. Petrini Review *APMIS* 114: 319-328, 2006

