

MINIRIVISTA

Il ruolo del laboratorio nella diagnosi della Tuberculosis e delle infezioni da Micobatteri non tubercolari*

Claudio Piersimoni

Comitato AMCLI per lo Studio dei Micobatteri (CoSMic)

*Il presente articolo è tratto da una presentazione tenuta agli "Advanced Seminars in Respiratory Medicine" (Napoli 24-28 febbraio 2002) successivamente pubblicata sotto forma di editoriale su *Monaldi Arch. Chest Dis.* 2002; 57: 306-310.

INTRODUZIONE

La diagnosi clinica di tubercolosi (TB) polmonare non è difficile per il medico esperto. Una storia clinica con tosse prolungata, febbricola, sudorazioni notturne e dimagrimento, il dato epidemiologico del contatto con persone affette da TB e talvolta il riscontro di una obbiettività a carico dell'apice polmonare inducono a proseguire le indagini diagnostiche richiedendo l'esecuzione di un radiografia del torace, di una intradermoreazione di Mantoux e di un esame dell'escreato per la ricerca dei bacilli alcool-acido resistenti (BAAR). La diagnosi diventa più complicata quando si ha a che fare con pazienti anziani, pediatrici o gravemente immunocompromessi (specialmente in caso di coinfezione con HIV). Inoltre, uno degli aspetti più inquietanti del recente aumento dei casi di TB in diverse aree geografiche è rappresentato dalla emergenza di stipiti tubercolari multi-resistenti (MDR). Episodi epidemici causati da ceppi MDR si sono verificati in rifugi per individui disagiati, in strutture ambulatoriali per la cura di pazienti con AIDS e negli ospedali. La causa di questi "clusters" epidemici era costituita nella quasi totalità dei casi da pazienti bacilliferi ai quali non era stata diagnosticata una TB polmonare conclamata. A riguardo, il Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), e la American Thoracic Society (ATS) raccomandano di eseguire il saggio di sensibilità ai farmaci (DST) su tutti i ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) e di inviare i risultati per conoscenza ai servizi di Sanità Pubblica. Questo contesto clinico-epidemiologico pone i laboratori di microbiologia clinica sotto pressione. Le attuali esigenze possono essere sintetizzate nell'imperativo: riducete al massimo i tempi di risposta!

Nel seguente articolo accanto ai metodi convenzionali (crescita dipendenti) vengono prese in considerazione anche le nuove metodologie biomolecolari utili per la diagnosi di laboratorio della TB.

ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DEL MTB DA CAMPIONI CLINICI.

a) Metodi convenzionali

Microscopia

Nonostante i più recenti progressi in micobatteriologia, uno dei capisaldi della diagnostica microbiologica è ancora oggi costituito dalla microscopia da cui dipendono in larga parte importanti provvedimenti di sanità pubblica, le misure di contenimento respiratorio e la somministrazione della terapia. La microscopia di per sé è scarsamente sensibile e non distingue i micobatteri del gruppo tubercolare da quelli non tubercolari. Tuttavia, alcuni accorgimenti possono contribuire ad elevarne il limite di sensibilità.

Selezione dei pazienti sulla base del sospetto clinico è fondamentale. I campioni clinici raccolti da pazienti con lesioni polmonari escavate hanno una più alta resa diagnostica (in termini di carica bacillare) di quelli ottenuti da pazienti con infiltrati o con lesioni extrapulmonari. Inoltre, il carico di lavoro dei laboratori dovrebbe essere alleggerito di tutti quei campioni raccolti da pazienti la cui evidenza clinica di tubercolosi è modesta o francamente trascurabile.

Qualità e quantità dei campioni. E' nozione comune che il ritrovamento di BAAR nei campioni respiratori (escreati in particolare) dipende in maniera sinergica dalla qualità e numero dei campioni esaminati. Dati recenti hanno dimostrato che l'esame di 2 campioni di buona qualità è in grado di diagnosticare la quasi totalità dei casi microscopico-positivi (6, 13). L'esame di un numero maggiore di campioni non aumenta in maniera significativa la resa diagnostica. La quantità consigliata è compresa fra 5 e 10 mL, mentre la qualità degli escreati dipende dal fatto che il materiale provenga dalle basse vie respiratorie e non contenga saliva (11, 25). Altri campioni respiratori quali espettorato indotto, broncoaspirato e lavaggio broncoalveolare pur necessitando per la raccolta di procedure più costose ed impegnative e non hanno dimostrato una miglior

resa diagnostica (3, 29).

Striscio diretto o dopo concentrazione del campione? L'esame di preparati microscopici a partire da sedimenti ottenuti dopo fluidificazione decontaminazione del campione viene attualmente considerato il metodo standard nei paesi industrializzati (14, 16). La considerevole frequenza di casi paucibacillari di TB rende lo striscio diretto un metodo inadeguato risultando in media un 15-30 % meno sensibile della microscopia dopo concentrazione.

Colorazione dello striscio. I micobatteri possono essere evidenziati sia mediante colorazioni a base di carbolfucsina (Ziehl-Neelsen, Kinyoun) o utilizzando fluorocromi (auramina o auramina-rodamine). Quest'ultimo metodo è più veloce consentendo di mantenere pari sensibilità microscopica con un tempo di lettura di 1½ minuti a vetrino contro i 5-10 richiesti dalle colorazioni a base di carbolfucsina. I principali limiti della microscopia sono rappresentati dalla scarsa sensibilità e dalla incapacità di distinguere, nei preparati ottenuti da materiali clinici, i micobatteri appartenenti al MTB dai micobatteri non tubercolari (NTM). Ciò in particolari contesti epidemiologici (pazienti HIV-positivi o aree ad alta prevalenza di NTM) rappresenta una limitazione non indifferente che oggi è possibile superare grazie all'impiego in microscopia di specifiche sonde molecolari dette "peptide nucleic acids" (PNAs). Esse ibridizzano con sequenze specifiche di DNA o RNA realizzando un legame più stabile della interazione DNA-DNA. A causa della loro natura idrofobica i PNAs penetrano agevolmente le pareti batteriche legandosi alle sequenze bersaglio. La coniugazione di queste sonde con un colorante fluorescente rende agevole la lettura microscopica consentendo nei preparati positivi la differenziazione fra MTB e NTM. Queste sonde hanno dimostrato una specificità molto buona specialmente nei confronti del MTB (4, 9).

Cultura

La sensibilità della coltura specialmente nei materiali respiratori è molto alta tanto da costituire a tutt'oggi il "golden standard" per la diagnostica della TB. Sebbene sia ampiamente dimostrato che i micobatteri crescano più rapidamente nei terreni liquidi, una minoranza di isolati clinici sono stati isolati esclusivamente su terreno solido. Queste evidenze sono le fondamenta dello standard attualmente raccomandato dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) che prevede l'associazione di terreno liquido e terreno solido per la coltura dei micobatteri (20). Così facendo, il tempo di crescita può essere notevolmente accorciato specialmente se si associa l'uso di sistemi automatici dotati di monitoraggio con-

tinuo della crescita. Il primo passo in questa direzione fu fatto dal Bactec 460 TB un sistema semi-automatico capace di rilevare la ¹⁴C-¹⁴CO₂ radiomarcata prodotta dai micobatteri a partire da un precursore (¹⁴C-acido palmitico) presente nel brodo di coltura. A distanza di un quarto di secolo dalla sua messa in commercio, il Bactec 460 TB rappresenta ancora il "gold standard" dei sistemi liquidi a cui ogni nuovo sistema deve necessariamente essere comparato. Questi ultimi si basano su brodi di coltura non-radiometrici che adottano differenti metodi di rilevamento come i sistemi fluorimetrici Bactec 9000MB e Bactec MGIT 960, il sistema presso metrico ESP Culture System II ed il sistema colorimetrico MB/BacT Alert. Tutti questi sistemi pur non raggiungendo ancora la sensibilità del Bactec 460 TB (27) offrono rispetto ad esso numerosi vantaggi:

- Assenza di costi aggiuntivi per lo smaltimento dei rifiuti radioattivi
- Completa automazione (risparmio sui costi di gestione del personale tecnico)
- Esecuzione dei test di sensibilità (DST) per tutti o quasi tutti i farmaci di prima linea
- Presenza di un programma informatico gestionale
- Ottimale sicurezza per gli operatori derivante dall'impiego di strumentazione priva di aghi
- Assenza di contaminazioni crociate ago-dipendenti

È importante notare che sebbene il sistema radiometrico sia ancora il più veloce in termini di rilevazione della crescita, la biomassa presente nel brodo è significativamente minore di quella presente negli altri sistemi al momento della positivizzazione. Ciò si ripercuote sul tempo finale di identificazione qualora vengano utilizzati sistemi molecolari di identificazione che non prevedendo una preventiva amplificazione (Accuprobe), sono biomassa dipendenti (15). Infine, sebbene la coltura viene considerata il metodo più sensibile per la diagnosi microbiologica di TB e micobatteriosi, falsi negativi possono derivare da procedure di decontaminazione eccessivamente lesive per i micobatteri, da recenti trattamenti chemioterapici o soprattutto da insufficiente qualità dei campioni.

Identificazione

Inizialmente la diagnosi di TB e la somministrazione della relativa terapia possono essere condotte su base empirica in assenza di una conferma microbiologica; più tardi, tuttavia, la diagnosi dovrebbe essere sempre confermata dalla coltura e dalla identificazione dell'isolato per evidenti ragioni. Innanzitutto, isolati clinicamente significativi di NTM sono in gran parte resistenti ai farmaci antitubercolari di prima scelta, secondaria-

mente l'isolamento di MTB comporta laboriose indagini per la profilassi dei contatti che non trovano giustificazione nel caso di malattia da NTM. Infine, il DST dipende necessariamente dalla coltura e data l'importanza emergente dei ceppi MDR-MTB è assolutamente indispensabile disporre di metodi rapidi per la identificazione ed il saggio di sensibilità dei ceppi isolati. In questo contesto, Gen-Probe ha rivoluzionato il laboratorio di micobatteriologia grazie alla introduzione delle sonde molecolari per la identificazione dei micobatteri (27). Accuprobe infatti, può identificare la maggior parte delle specie comunemente isolate in laboratorio a partire dalla biomassa di una coltura liquida o solida nel giro di circa 2 ore. Queste sonde hanno considerevolmente abbreviato i tempi di diagnosi e trattamento dei pazienti con TB e sono diventate fondamentali per la identificazione di MTB, *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii* e *M. goodii*. Dal momento che Accuprobe non è in grado di discriminare all'interno del MTB né di identificare altre specie di NTM, i laboratori sono costretti ad impiegare altri sistemi a questo scopo. *M. bovis* (MB) o *M. bovis* [BCG] possono essere identificati mediante test biochimici la cui scarsa riproducibilità e difficoltà di interpretazione sono a tutti ben note. La negatività ai test della riduzione dei nitrati e della produzione di niacina sono comuni ad entrambe le suddette specie, mentre la sensibilità alla idrazide dell'acido tiofen-2-carbossilico (TCH) discrimina MB e BCG da MTB che è resistente. Infine, la resistenza alla Pirazinamide (PZA) può essere utilizzato come marker accessorio per riconoscere MB a BCG (18).

Sistemi alternativi ai tradizionali test biochimici sono stati elaborati per differenziare il maggior numero di specie micobatteriche. Il NAP è un precursore della sintesi del cloramfenicolo e viene utilizzato in un test radiometrico interpretabile in 3-5 giorni per differenziare le specie appartenenti al MTB (sensibili) dai NTM (resistenti) (8, 12). La composizione degli acidi micolici di parete studiata mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) (21) ed il sequenziamento del gene 16S rRNA costituiscono metodiche diffusamente impiegate nei laboratori di riferimento che hanno consentito la identificazione di tutti i micobatteri precedentemente conosciuti e la recente scoperta di numerose nuove specie (24). In aggiunta alle sonde Accuprobe, è stato recentemente messo in commercio dalla Innogenetics un nuovo metodo che consente la identificazione da coltura di MTB e di altre 13 specie di NTM (7 nella prima versione del Kit) (22, 23). INNO-LiPA Mycobacteria utilizza la tecnologia della ibridazione inversa in fase solida: il prodotto otte-

nuto dalla amplificazione (PCR) della regione spaziatrice del gene 16-23 S rRNA viene fatto ibridare con sonde specie-specifiche legate su una membrana di nylon e l'avvenuta ibridazione visualizzata mediante una reazione che sviluppa colore.

Test di Sensibilità ai Farmaci (DST)

La TB e le infezioni da NTM richiedono approcci terapeutici generalmente non sovrapponibili. Inoltre, il recente incremento della resistenza ad isoniazide [INH] e rifampicina [RMP] fa sì che la terapia antitubercolare non possa essere somministrata in assenza dei risultati del DST. Poiché fattori epidemiologici quali precedenti trattamenti antitubercolari, provenienza da paesi ad alta endemia di ceppi MDR e condizioni di vita disagiate non sono sufficientemente predittivi di MDR-TB, il laboratorio di micobatteriologia ha assunto un ruolo chiave nella individuazione rapida delle resistenze. Attualmente, i DST dipendono quasi completamente da sistemi legati alla crescita del ceppo in esame. Esistono 3 metodi per la determinazione della farmaco-sensibilità nei micobatteri del complesso tubercolare: il metodo proporzionale, quello della concentrazione assoluta e quello del rapporto di resistenza. La maggior parte dei laboratori nei paesi industrializzati usa una variante del metodo proporzionale secondo gli standard proposti dal National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS). Il prestigioso ente americano ha stabilito le linee guida per il saggio dei farmaci antitubercolari primari (INH, RMP, etambutolo, e PZA), standardizzato le procedure per il saggio dei farmaci antitubercolari di seconda scelta e messo a punto il DST per alcune specie di NTM (28). I DST per il MTB possono essere eseguiti sia in terreno solido (7H10) o più frequentemente in terreno liquido capace di fornire i risultati in meno di 7 giorni. La resistenza è definita come la crescita nel terreno antibiotato di una popolazione batterica > dell'1% di quella osservata nel terreno di controllo. Possibili alternative al DST convenzionale includono il sistema della luciferasi (2) (usando i fagi phAE40 and phGS18) e la citometria a flusso (10) entrambi in grado di distinguere ceppi di MTB sensibili da quelli resistenti nel giro di 24-48 h.

b) Metodi Molecolari Rapidi

Ricerca Diretta di MTB nei Campioni Clinici

In virtù di una sensibilità teoricamente capace di evidenziare una singola sequenza genomica, la comparsa dei test di amplificazione (NAT) fu annunciata come una vera pietra miliare nel campo della micobatteriologia. Sfortunatamente, a distanza di oltre 10 anni la valutazione di questi test viene oggi condotta con un atteggiamento meno trionfalistico e decisamente più pragmatico.

In effetti, sebbene la specificità dei NAT si sia dimostrata molto buona, la loro sensibilità è inferiore a quella della coltura. Attualmente, il metodo più efficace per aumentare la affidabilità dei NAT consiste nell'applicarli a campioni clinici raccolti in modo congruo per qualità e quantità da pazienti per i quali la TB rappresenti una solida ipotesi diagnostica. In questo contesto, un risultato positivo usando "primers" specifici per il MTB ottenuto da un campione positivo all'esame microscopico conferma la presenza di MTB, mentre un analogo risultato negativo indica la presenza di NTM solo dopo aver escluso la presenza di sostanze inibenti. I campioni microscopico-negativi sono i più impegnativi a causa dello scarso contenuto di micobatteri, della disomogenea distribuzione degli stessi all'interno del campione e della emissione talvolta discontinua durante la espettorazione. Per questo motivo, la NAT-negatività di un campione negativo all'esame microscopico non esclude la TB ed ulteriori campioni dovrebbero essere esaminati se il sospetto clinico permane. Numerosi NAT sono stati messi a punto negli ultimi anni, ma solo i sistemi commerciali hanno avuto una applicazione su larga scala nei laboratori di micobatteriologia clinica. Essi comprendono il sistema COBAS Amplicor (Roche) basato sulla PCR, il sistema AMTD (Gen-Probe) che utilizza la tecnica TMA (transcription mediated amplification) entrambi approvati dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA), ed il sistema BD ProbeTec ET che impiega la tecnica SDA (strand displacement amplification). COBAS Amplicor e BD ProbeTec ET contengono un controllo interno di amplificazione composto da una sequenza di DNA sintetico che viene amplificato simultaneamente alla sequenza bersaglio. La mancata amplificazione della sequenza di controllo indica la presenza di sostanze inibenti discriminando così fra veri-negativi e falsi-negativi (17). In tal caso il risultato non è interpretabile ed il campione non può essere utilizzato per la ripetizione del test. Sebbene le sostanze inibenti siano diverse ed interagiscano in maniera differente con i sistemi di amplificazione, esse difficilmente contaminano tutti i campioni raccolti da uno stesso paziente per cui testando più campioni il problema viene generalmente superato. Infine, si raccomanda che i NAT non siano mai utilizzati disgiunti dalle metodiche convenzionali (microscopia e coltura) e sempre interpretati alla luce del quadro clinico del paziente.

Individuazione di Ceppi MTB Resistenti Direttamente nei Campioni Clinici

Il DST acquista una valenza genotipica quando ricerca la presenza di mutazioni correlate alla resistenza. In tal caso, la ricerca è svincolata dalla

crescita in coltura e conseguentemente molto più rapida (19). Attualmente l'unico chemioterapico per il quale questo approccio risulti conveniente è la RMP poiché la quasi totalità delle mutazioni correlate alla resistenza sono confinate in un breve segmento del gene che codifica per la subunità della RNA polimerasi. Due kit commerciali (InnoLiPA Rif.TB and RNA-RNA mismatch) sono disponibili per la simultanea ricerca ed identificazione della resistenza alla RMP di MTB direttamente dal campione microscopico-positivo o da coltura. Entrambi i kit hanno mostrato una eccellente correlazione con gli standard di riferimento (5, 26).

Test Sierologici

Sebbene la sierologia rappresenti l'approccio diagnostico più semplice ed economico in campo infettivologico, nel caso della TB essa costituisce di tutto l'armamentario attualmente disponibile, l'arma meno efficace. Le maggiori limitazioni nascono dalla difficoltà di distinguere i soggetti infettati ma asintomatici (semplicemente cutipositivi) dai soggetti con malattia in atto (1). Le attuali conoscenze sulla dinamica della risposta anticorpale in corso di TB deriva da studi che hanno utilizzato differenti antigeni proteici purificati di *M. tuberculosis*. Si è potuto osservare che la risposta anticorpale in corso di malattia tubercolare si sviluppa nella quasi totalità dei pazienti (più del 90% producono anticorpi specifici della classe IgG) ed è diretta simultaneamente contro numerosi antigeni micobatterici. Inoltre, la sierconversione in corso di malattia è estremamente eterogenea dal momento che per nessun antigene o gruppo di antigeni i pazienti sierconvertono nel 100% dei casi. Ciò significa quindi che non è la mancanza di anticorpi a rendere inefficaci gli attuali test sierologici, bensì la inadeguatezza degli stessi a valutare la risposta sierologica. In questo contesto, è opinione diffusa che l'utilizzo di antigeni multipli possa offrire risultati migliori di quanto sinora ottenuto impiegando antigeni singoli. Un ulteriore supporto in favore della messa a punto di test sierologici multiantigenici sta nella possibilità di correlare la risposta ad alcuni di questi antigeni con l'evoluzione prognostica della malattia tubercolare. Questo approccio corretto dal punto di vista teorico incontra considerevoli difficoltà tecniche connesse alla individuazione di una fase solida idonea ad ospitare i diversi antigeni. Dati in questo senso sembrano accantonare il metodo ELISA in favore di nuovi supporti quali le membrane di nitrocellulosa (7). In conclusione, nonostante gli scarsi risultati sin qui ottenuti, la potenziale utilità e diffusione di un test sierologico nel campo della diagnostica tubercolare sembra giustificare ampiamente ulteriori

investimenti in ricerca e sviluppo.

Il Futuro del laboratorio di Micobatteriologia

La seguente lista rappresenta alcuni degli obiettivi diagnostici più significativi da conseguire in un prossimo futuro:

- automazione completa dei sistemi di amplificazione, coltura e DST
- applicazione delle tecniche biomolecolari direttamente sui campioni di ogni tipo senza necessità delle procedure di decontaminazione
- ampliamento dei kit commerciali di identificazione a tutte le specie del genere *Mycobacterium* implicate in patologia umana
- test sierologici per la diagnosi di TB attiva
- individuazione e ricerca da campione clinico di tutti i geni di resistenza correlati al MTB
- identificazione molecolare di specie direttamente da frammenti di tessuto fissati ed inclusi
- test di amplificazione quantitativa al fine di monitorare l'infettività dei pazienti e la risposta alla terapia

BIBLIOGRAFIA

1. Al Zahrani K, Al Jahdali H, Poirier L, Renè P, Gennaro ML, Menzies D. Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic tests for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1323-1329.
2. Carriere C, Riska PF, Zimhony O, Kriakov J, Barbarov S, Burns J, Chan J, Jacobs Jr WR. Conditionally replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3232-3239.
3. Conde MB, Soares SLM, Mello FCQ, Rezende VM, Almeida LL, Reingold AL, Daley CL, Kritski AL. Comparison of sputum induction with fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2238-2240.
4. Drobniowski FA, More PG, Harris GS. Differentiation of *Myc. tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacterial liquid cultures by using peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 444-447.
5. Drobniowski FA, Watterson FA, Wilson SM, Harris GS. A clinical, microbiological and economical analysis of a national service for the rapid molecular diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance in *M. tuberculosis*. *J Med Microbiol* 2000; 49: 271-278.
6. Finch D, Beaty CD. The utility of a single sputum specimen in the diagnosis of tuberculosis. *Chest* 1997; 111: 1174-1179.
7. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2000; 30 (Suppl 3): S243-S246
8. Gross WM, Hawkins JE. Radiometric selective inhibition tests for differentiation of *M. tuberculosis* *M. bovis* and other mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 565-568.
9. Hongmanee P, Stender H, Rasmussen OF. Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of Löwentein-Jensen and mycobacteria growth indicator tube cultures using peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1032-1035.
10. Kirk SM, Schell RF, Moore AV, Callister SM, Mazurek GH. Flow cytometric testing of susceptibilities of *M. tuberculosis* isolates to ethambutol, isoniazid and rifampin in 24 hours. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1568-1573.
11. McCarter Y, Robinson A. Quality evaluation of sputum specimens for mycobacterial culture. *Am J Clin Path* 1996; 105: 769-773.
12. Morgan MA, Doerr KA, Hempel HO, Goodman NL, Roberts GD. Evaluation of the NAP differential test for identification of *M. tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 634-635.
13. Nelson SM, Deike MA, Cartwright CP. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 467-469.
14. Peterson EM, Nakasone A, Platon De Leon JM, Jang J, De La Maza L, Desmond L. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for *Mycobacterium* spp. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3564-3568.
15. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Passerini Tosi C, Nista D, Bornigia S, Scagnelli M, Rigon A, Ruggiero G, Goglio A. Comparison of MB/BacT Alert 3D system with radiometric Bactec system and Löwentein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 651-657.
16. Ratnam S, March SB. Effect of relative centrifugal force and centrifugation time on sedimentation of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 582-585.
17. Richeldi L, Barnini S, Saltini C. Molecular diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995; 8 Suppl 20, S689-S700.
18. Salfinger M, Pfyffer GE. The new diagnostic mycobacteriology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 961-979.
19. Telenti A. Genetics of drug resistant tuberculosis. *Thorax* 1998; 53: 793-797.
20. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good RC. The resurgence of tuberculosis: is your lab ready? *J Clin Microbiol* 1993; 41: 767-770.
21. Tortoli E, Bartoloni A. High-performance liquid chromatography and identification of mycobacteria. *Rev Med Microbiol* 1996; 7: 207-219.
22. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4418-4420.
23. Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, Cichero P, Farina C, Mucignat G, Scarparo C, Bartolini L, Valentini R, Nista D, Gesu G, Passerini Tosi C, Crovatto M, Brusarosco G. Performance assessment of a new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1079-1084.
24. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 319-354.
25. Warren JR, Bhattacharya M, De Almeida KNF, Trakas K, Peterson LR. A minimum 5.0 ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smears for *M. tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1559-62.
26. Watterson FA, Wilson SM, Yates MD, Drobniowski

- FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998; 36: 1969-1973.
27. Watterson SA, Drobniewski FA. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections. J Clin Pathol 2000; 53: 727-732.
28. Woods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. Clin Infect Dis 2000; 31: 1209-1215.
29. Yajko DM, Nassos PS, Sanders CA, Madej JJ, Handley WK. High predictive value of the acid-fast smear for *M. tuberculosis* despite the high prevalence of *M. avium* complex in respiratory specimens. Clin Infect Dis 1994; 19: 334-336.

Claudio Piersimoni

Sezione di Microbiologia,
Laboratorio di Patologia Clinica
Dipartimento di Patologia ed Analisi
A.O. "Umberto I°",
Via Conca, I - 60020 Ancona
Tel.: 071-596.3049; Fax: 071-596.4184
E-mail: c.piersimoni@ao-umbertoprime.marche.it