
008

IL PRIMO SISTEMA DEDICATO PER LA IDENTIFICAZIONE DEI MICOBATTERI IN HPLC

G. Bruno

U.O. Medicina di Laboratorio - Ospedale San Salvatore - L'Aquila

L'identificazione dei micobatteri atipici e non tramite estrazione degli acidi micolici e corsa cromatografica ad alta risoluzione (HPLC) è sempre stata riservata a pochi laboratori in Italia e nel mondo. Nonostante il basso costo di una tipizzazione in HPLC rispetto a più noti sistemi di tipizzazione di biologia molecolare (INNO-Lipa Mycobacteria), la bassa diffusione di questa tecnica è dovuta sia alla mancanza di un apparecchio di cromatografia liquida dedicata, sia al fatto di dover preparare le fasi mobili e i reattivi estraenti in casa (home-made), che alla difficoltà nel reperire personale tecnico e laureato esperto di HPLC nei laboratori clinici.

Da poco più di un anno è entrato in commercio il primo sistema di identificazione dei micobatteri "chiavi in mano" validato FDA, sviluppato e commercializzato dalla MIDI inc. Newark, DE, USA (www.midi-inc.com).

Un software dedicato (altra grande novità) confronta il profilo degli acidi micolici estratti con un database di profili di micobatteri specie e gruppi.

La metodica tradizionale in uso nei pochi laboratori di cui si è accennato fu sviluppata dal CDC "HPLC Users group" che ha messo a disposizione degli utenti un manuale facilmente reperibile in Rete. Il sistema in commercio ha il nome di "Sherlock Mycobacteria Identification System" e differenzia molto bene *M. tuberculosis complex* dai micobatteri ati-

pici. L'identificazione definitiva dei MOTT richiede l'uso di test addizionali per una completa identificazione. Ogni test costa meno di 4 euro a campione comprensivi di reagenti, standard interni, standard di calibrazione. In una ora si analizzano 4 campioni. Per l'estrazione occorrono almeno 2 ore. La rilevazione avviene in fluorescenza e la sensibilità di questo detector comporta che si possano estrarre gli acidi micolici già da poche colonie cresciute in LJ o Middlebrook 7H10 (or 7H11).

Come è noto il primo step di estrazione uccide le cellule vive (mediante addizione di una soluzione di KOH seguita da autoclavaggio per 30 minuti) e questo è importante per la sicurezza di tutto il processo.

Inoltre questo sistema in commercio non usa il Cloruro di metilene che è molto tossico. Il sistema HPLC è Agilent a gradiente di eluizione cioè con una doppia pompa che mescola le due fasi mobili in continuo e bassa pressione.

Come detto la rivelazione è in fluorescenza ed è circa 1000 volte più sensibile dell'UV tradizionale. In futuro per diminuire il tempo di risposta sarà presentato un sistema che tipizza il ceppo già da colture liquide.

Ma il passo successivo sarà l'uso dell'HPLC che permetta l'identificazione dei micobatteri già nel campione del paziente.
