



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

*Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico*

**APPROPRIATEZZA PRESCRITTIVA DEL  
TEST QUANTIFERON®-TB GOLD PLUS  
NELL'AZIENDA OSPEDALIERA OSPEDALI  
RIUNITI MARCHE NORD**

*Tesi di:*  
*Alessia Carletti*

*Relatore:*  
*Dott.ssa Barbara Pieretti*

*Anno accademico 2019/2020*

# INDICE

1. Introduzione.....	pag. 2
2. Scopo della tesi.....	pag. 4
3. L'infezione tubercolare.....	pag. 5
4. Diagnosi di laboratorio dell'infezione tubercolare.....	pag. 22
4.1. Diagnosi microscopica ed esame colturale.....	pag. 22
4.2. Diagnosi molecolare.....	pag. 52
4.3. Diagnosi di laboratorio dell'infezione tubercolare latente.....	pag. 60
4.3.1. Il test di intradermoreazione secondo Mantoux.....	pag. 60
4.3.2. Interferon-Gamma Releasing Assay (test IGRA).....	pag. 68
4.3.3. Linee guida sull'utilizzo dei test IGRA.....	pag. 76
5. Materiali e Metodi.....	pag. 83
5.1. Modalità di prelievo e trattamento del campione.....	pag. 83
5.2. Caratteristiche dello strumento Liaison XL.....	pag. 85
5.3. Caratteristiche del test QuantiFERON®-TB Gold Plus.....	pag. 88
5.4. Modulo di raccolta dei dati clinico-anamnestici.....	pag. 91
5.5. Elaborazione dati e analisi statistica.....	pag. 91
6. Risultati.....	pag. 92
7. Discussione.....	pag. 97
8. Conclusioni.....	pag. 98
9. Bibliografia e link utili.....	pag. 100

## 1. INTRODUZIONE

La tubercolosi (TB) è una malattia contagiosa, trasmessa quasi esclusivamente per inalazione di goccioline (droplet) emesse da portatori di patogeni del *M. tuberculosis* complex. La TB rappresenta un problema di salute pubblica a livello globale <sup>[1]</sup> con un'incidenza di circa 10,0 milioni di nuovi casi e circa 1,5 milioni di decessi nel 2018, a tal punto che l'OMS ha introdotto nel 2014 la "End TB Strategy" con lo scopo di ridurre il tasso di incidenza e il numero di decessi associati alla tubercolosi, garantendo cura, sorveglianza e prevenzione <sup>[2]</sup>. Uno dei cardini più importanti per il controllo della tubercolosi è la diagnosi e il trattamento dell'infezione tubercolare latente (LTBI), che colpisce circa un terzo della popolazione mondiale e, nel 5-10% dei casi, se non adeguatamente trattata, progredisce a malattia attiva, responsabile di circa 1,2 milioni di decessi l'anno. Il trattamento preventivo, infatti, permette, non solo di guarire il soggetto infetto, ma di ridurre la diffusione dell'infezione nella collettività. Per questo motivo, una componente essenziale per il controllo e la gestione della tubercolosi, è l'identificazione di individui infetti da *M. tuberculosis* complex, ai quali offrire la terapia preventiva per evitare la progressione verso la tubercolosi attiva e prevenire un'ulteriore trasmissione del patogeno. In questo contesto l'OMS e altre organizzazioni internazionali hanno ampliato le loro linee guida per lo screening di individui ad alto rischio, ottimi candidati per il trattamento. La tubercolosi latente viene attualmente diagnosticata con il test cutaneo secondo Mantoux (TST) o con ricerca, su sangue, di linfociti T sensibilizzati verso antigeni specifici di *M. tuberculosis*, mediante misurazione della produzione di IFN-gamma. Il TST viene usato nella maggior parte delle aree europee, ma non è in grado di discriminare tra una potenziale infezione dalla vaccinazione preventiva con BCG, o da un'eventuale infezione da micobatteri non tubercolari (NTM). I test di rilascio dell'interferone (IGRA) sono test immunitari in vitro, introdotti negli ultimi anni come alternativa al TST per la diagnosi di LTBI. Questi test utilizzano antigeni quasi esclusivamente espressi dal *M. tuberculosis* complex. Gli IGRA, data la maggiore specificità, hanno meno probabilità di essere influenzati da una precedente vaccinazione con BCG e/o dall'esposizione a NTM. Numerosi paesi hanno finora adottato IGRA per la diagnosi di LTBI nell'ambito dei programmi di screening della tubercolosi; sono infatti disponibili documenti relativi alle linee guida adottate per il loro utilizzo. Da sottolineare, però, l'importanza di avere prove stabili e valide a sostegno dell'implementazione di

IGRA nei programmi nazionali di screening della tubercolosi, che si cerca di ottenere grazie al confronto tra i risultati di studi condotti in diverse aree geografiche con caratteristiche di incidenza e prevalenza della malattia differenti, oltre ad un confronto nell'utilizzo del test nei vari gruppi all'interno della popolazione, identificati come a maggiore o minore rischio. Stanno, inoltre, emergendo prove sull'effettivo valore predittivo degli IGRA relativo, ad esempio, alla relazione tra un risultato IGRA positivo o negativo e la probabilità di sviluppare, o meno, la tubercolosi. Per sostenere ulteriormente i programmi di sanità pubblica, è pertanto necessaria una valutazione continua dell'uso dell'IGRA per la diagnosi delle LTBI.

Il lavoro condotto in questo progetto di tesi ha l'obiettivo di valutare l'appropriatezza prescrittiva del test QuantiFERON® - TB Gold Plus nell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord, introdotto nella diagnostica di laboratorio in seguito ad un approccio multidisciplinare, con lo scopo di rendere il test disponibile all'interno di percorsi diagnostici appropriati, come reflex o complementare alla Mantoux, in una popolazione selezionata di pazienti, confermando la necessità da parte del Microbiologo Clinico di intervenire e presidiare l'appropriatezza della richiesta. La valutazione dell'appropriatezza di un test di laboratorio, intesa come "capacità del test di modificare l'*outcome* o la decisione medica ... ed è coerente con le conoscenze mediche correnti", è necessaria per promuovere la compilazione di una richiesta adeguata da parte del clinico, al fine di eseguire l'esame giusto, per il paziente giusto, in grado di rispondere ad un quesito appropriato proposto nel momento appropriato. Una corretta appropriatezza prescrittiva e l'utilità di un test di laboratorio all'interno di un percorso diagnostico sono necessarie a promuoverne il corretto utilizzo, evitandone un sotto- o sovra-utilizzo, migliorare l'efficacia del test e il suo potenziale diagnostico, oltre a numerosi vantaggi relativi alla sicurezza del paziente, ai costi sanitari e ai processi decisionali da parte del clinico per improntare un corretto programma terapeutico sulla base delle informazioni ottenute dal laboratorio.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Il presente lavoro di tesi si propone di valutare attraverso un'analisi retrospettiva dei dati di laboratorio l'appropriatezza prescrittiva del test QuantiFERON® - TB Gold Plus nell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord all'interno di percorsi diagnostici condivisi.

Il laboratorio analisi dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord ha iniziato ad occuparsi di questo tipo di test nel 2017 attraverso un approccio multidisciplinare, e la condivisione di linee di indirizzo per una corretta prescrizione del test in associazione e/o in alternativa al test di Mantoux in specifiche categorie di soggetti.

Si tratta di un test indiretto con alto potere informativo clinico, *cost-effective* rispetto alla Mantoux, che richiede un importante consumo di risorse, in grado di rilevare in vitro le risposte immuni cellulo-mediate (CD4+, CD8+) agli antigeni peptidici ESAT-6 e CFP-10 associati all'infezione da *M. tuberculosis*.

L'elaborazione statistica dei dati ha permesso di valutare e ritenere congrua appropriatezza della richiesta del test da parte dei medici ospedalieri e dei medici territoriali (MMG e PdLS).

### 3. L'INFEZIONE TUBERCOLARE

La tubercolosi è una malattia infettiva causata da micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis complex*, che comprende diverse specie tra cui il *Mycobacterium tuberculosis*. Si tratta di microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Mycobacteriaceae* e all'ordine degli *Actinomycetales*. Sono piccoli bacilli, lunghi da 2-4 µm, molto sottili, con un diametro trasverso di 0.2-0.5 µm, immobili, aerobi obbligati, asporigeni, caratterizzati da una crescita lenta <sup>[3]</sup>. Peculiarità che li distingue riguarda la composizione della parete cellulare, ricca di polisaccaridi, glico-lipidi e lipidi complessi; esternamente alla membrana cellulare, il peptidoglicano è covalentemente legato ad arabinogalattani (polisaccaridi a lunga catena), lipo-arabino-mannani (LAM) e lipo-mannani. La caratteristica composizione risulta responsabile dell'acido-resistenza, ovvero la resistenza alla decolorazione con acido, dopo colorazione con fucsina, che li contraddistingue da altri microrganismi. Al genere *Mycobacterium* appartengono molte altre specie denominate micobatteri non tubercolari (NTM) o micobatteri atipici o MOTT (Mycobacteria Other Than Tuberculosis), non appartenenti al gruppo *Mycobacterium Tuberculosis Complex* (MTC), dal quale devono essere necessariamente distinti per il diverso significato clinico ed epidemiologico.

#### ***Epidemiologia***

Il "Global tuberculosis report 2019" <sup>[1]</sup> conferma la tubercolosi come una delle prime cause di morte nel mondo. Il documento fornisce i dati di 201 Paesi e territori, coprendo il 99% della popolazione mondiale e dei casi di TB. Si stima un'incidenza di 10,0 milioni di nuovi casi di soggetti che si sono ammalati nel 2018, un numero rimasto relativamente stabile nel tempo. Il peso della malattia è visibilmente variabile tra i vari paesi, da meno di cinque a più di 500 nuovi casi ogni 100.000 abitanti ogni anno, con una media globale di circa 130 casi. Si sono verificati circa 1,2 milioni (considerato un intervallo di 1,1-1,3 milioni) di decessi per TB tra persone HIV-negative nel 2018 (diminuzione del 27% dai 1,7 milioni nel 2000); e ulteriori 251.000 decessi tra soggetti HIV-positivi (diminuzione del 60% rispetto a 620.000 nel 2000). Si osservano differenze, oltre all'area geografica, tra età, razza, sesso e condizione socio-economica. È stata registrata una maggiore frequenza tra gli uomini di età  $\geq 15$  anni, rappresentanti del 57% di tutti i casi di tubercolosi nel 2018; mentre le donne hanno rappresentato il 32% e i bambini, considerati

in età < 15 anni, l'11%. Da un punto di vista geografico, la maggior parte dei casi, si è registrata nelle regioni del Sud-est asiatico (44%), in Africa (24%) e nel Pacifico occidentale (18%), con percentuali minori nel Mediterraneo orientale (8%), nelle Americhe (3%) ed Europa (3%). Otto paesi rappresentavano i due terzi del totale globale: India (27%), Cina (9%), Indonesia (8%), Filippine (6%), Pakistan (6%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) e Sud Africa (3%). L'Organizzazione mondiale della sanità, in seguito all'approvazione dall'Assemblea mondiale della sanità di 194 Stati membri nel 2014, ha introdotto una strategia globale (Strategia End TB), che pone i pazienti e le comunità al centro della risposta, assicurando la prevenzione, la cura e la sorveglianza della malattia, al fine di ridurre il tasso di incidenza e il numero di decessi <sup>[2]</sup>. A livello globale, tra il 2000-2018, il tasso medio di diminuzione dell'incidenza della TB è stato dell'1,6%; mentre tra il 2017-2018 è stato di 2,0%. Il valore cumulativo della riduzione dell'incidenza tra il 2015-2020 è pari all'11%, inferiore al 20% previsto tra i traguardi della End TB Strategy dell'OMS. In merito ai decessi, tra il 2015-2018, si è osservata una riduzione dell'11%, molto lontano dal traguardo proposto dall'OMS del 35% entro il 2020.

I dati dell'OMS relativamente alla la Regione Europea dell'OMS sono confortanti rispetto agli obiettivi della End TB Strategy, infatti riportano una diminuzione del tasso di incidenza del 15 % tra il 2015-2018, con riduzione del numero dei decessi pari al 24%. Dati relativi alla Regione Africana dimostrano una riduzione del 12% dell'incidenza, e del 16% del numero di decessi tra il 2015-2018.

I dati per l'Italia provengono dal sistema di notifica dei casi di tubercolosi del Ministero della Salute e costituiscono il flusso informativo ufficiale, cui si fa riferimento per il monitoraggio della malattia in Italia. I dati più recenti sono pubblicati nel documento congiunto ECDC e OMS Europa "Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2019" e confermano l'Italia come uno dei Paesi a bassa incidenza di malattia (<20/100.000) <sup>[5]</sup>. Nel 2017 sono stati notificati 3.944 casi di tubercolosi (incidenza di 6,5/100.000 abitanti), di quali 3.828 sono stati classificati come nuovi casi (6,3/100.000 abitanti). Sul totale dei casi notificati il 70,3% è riferibile a una TB polmonare confermata nel 44,2% da un esame microscopico positivo e nell'80,5% dei casi totali dalla conferma della diagnosi di laboratorio. Il 66,2% dei casi totali notificati si è verificato in soggetti di origine straniera registrando una differenza significativa

nell'insorgenza della malattia rispetto alla popolazione italiana (34,3 anni vs 50,9). Sono stati notificati 66 casi di TB multi-resistente (2,5% del totale dei casi notificati) di cui 5 casi di TB estremamente multi resistente (XDR TB).

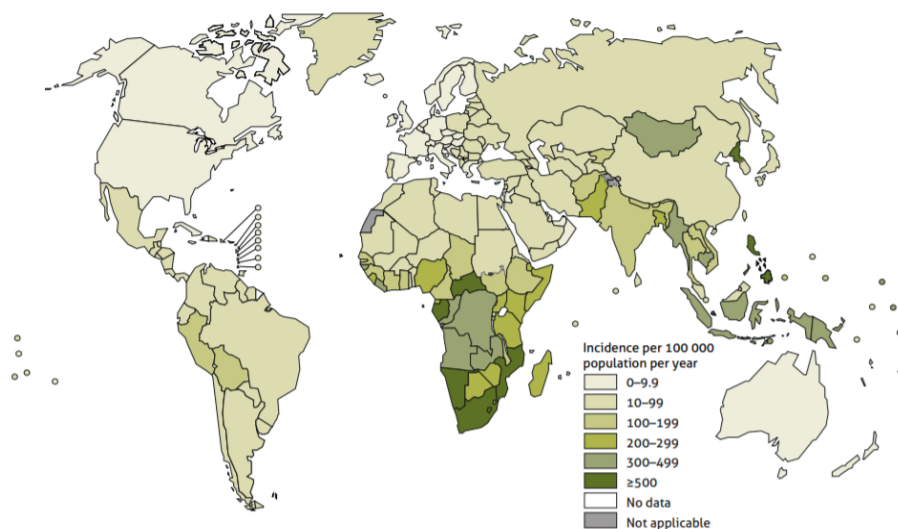


Figura 1 – Rappresentazione dei tassi di incidenza della tubercolosi stimati nel 2018

### **Trasmissione**

La tubercolosi si trasmette per via aerea da persona a persona attraverso le goccioline di saliva emesse con starnuti, colpi di tosse, fonazione, baci, ecc (droplet nuclei, particelle con diametro  $< 5\mu$ ). Il nucleo della gocciolina, contenente i bacilli, viene emesso tramite colpi di tosse, eventualmente starnuti, ma anche con il parlare e cantare.

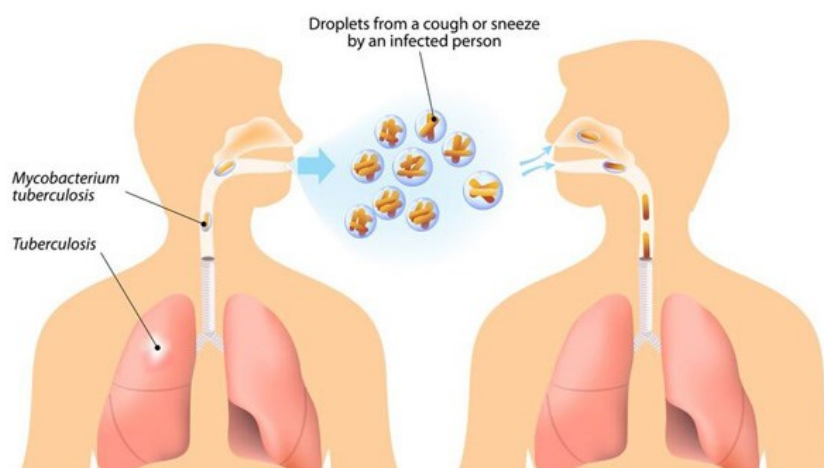


Figura 2 – Trasmissione tramite droplets del *M. tuberculosis*



Il rischio di essere infettati dipende:

- dalla concentrazione dei micobatteri nell'aria circostante
- dalla virulenza del microrganismo
- dalla durata dell'esposizione
- dalla predisposizione individuale del soggetto che entra in contatto con l'ammalato, in particolare dallo stato del suo sistema immunitario.

Le goccioline possono rimanere sospese nell'ambiente per diverse ore, aumentando la probabilità di trasmissione; tuttavia, una volta che raggiungono una superficie, è difficile che i microrganismi ritornino in sospensione nell'aria (p. es., spazzando il pavimento, scuotendo lenzuola) come particelle respirabili. Si ritiene che, nella maggior parte dei casi, sia necessario trattenersi per parecchie ore in un locale non sufficientemente aerato affinché abbia luogo una trasmissione. Nel caso di persone immunodepresse, però, un contagio può avvenire già dopo un'esposizione di breve durata. La trasmissione è facilitata da esposizioni frequenti o prolungate con pazienti non trattati che disperdono un gran numero di bacilli tubercolari in spazi chiusi, sovraffollati e poco ventilati. Conseguentemente persone che vivono in carenti condizioni abitative o all'interno di istituti sono particolarmente a rischio. Gli operatori sanitari a stretto contatto con casi con infezione attiva sono a rischio maggiore. Le stime di contagiosità variano ampiamente: l'OMS stima che ogni paziente non trattato può infettare 10-15 persone all'anno, tuttavia, la maggior parte di coloro che acquisiscono l'infezione non sviluppa malattia attiva. La tubercolosi a carico di tonsille, linfonodi, organi addominali, ossa e articolazioni, comunemente causata dall'ingestione di latte o suoi derivati contaminati da *M. bovis*, è stata in gran parte debellata nei Paesi sviluppati, sacrificando le mucche con test cutaneo positivo alla tubercolina e con la pastorizzazione del latte. La tubercolosi da *M. bovis* è ancora presente nei paesi in via di sviluppo, in alcuni dei quali è endemica (alcuni paesi dell'America Latina).

### ***Meccanismo azione patogena***

Il meccanismo dell'azione patogena di *M. tuberculosis* è tutt'oggi oggetto di dibattito. È stato dimostrato come, non producendo esotossine e non essendo provvisto dell'endotossina (LPS) caratteristica dei Gram negativi, il principale meccanismo dell'azione patogena sia la resistenza al *killig* intracellulare nelle cellule fagocitarie.

Molti componenti cellulari del microrganismo sono dotati di azione tossica che si estrinseca soprattutto nei confronti dei macrofagi, ostacolando quindi l'attività fagocitaria della cellula (anche in macrofagi attivati) con 2 meccanismi: sia con l'inibizione della fusione fagosoma–lisosoma; sia con l'inibizione dell'acidificazione del contenuto del fagolisosoma. Un ruolo importante sembra sia svolto dal fattore cordale.

Nel *M. tuberculosis* il fattore principale di virulenza è, infatti, rappresentato dal fattore cordale costituito da dimicolato trealosio, ossia 2 acidi micolati complessati al trealosio, così chiamato perché al microscopio appare serpentiforme. Tale fattore risulta coinvolto nella protezione da stress ambientali e ossidativi, contribuisce alla bassa permeabilità della parete che conferisce una naturale resistenza ai farmaci, per lo più idrofilici, ed è coinvolto nella persistenza nei tessuti dell'ospite. Lo studio del genoma ha, inoltre, permesso di evidenziare la presenza di una sequenza genomica di 10,7 kb, chiamata RD1, regione di differenza che codifica per numerose proteine, tra cui gli antigeni ESAT-6 e CFP10. Tale regione è assente nel ceppo vaccinico *M. bovis* BCG ed è stato dimostrato come l'attenuazione di quest'ultimo sia dovuta all'assenza di RD1, presente invece nel *M. tuberculosis*, patogeno per l'uomo. Infatti l'inserimento della regione RD1 nel genoma di BCG ha come risultato un aumento della virulenza del ceppo BCG ricombinante.

### ***Fisiopatologia***

Lo sviluppo e l'evoluzione dell'infezione tubercolare sono condizionati da diversi fattori, tra i quali il più determinante è rappresentato dallo stato immunitario dell'ospite nei confronti dell'agente eziologico. La tubercolosi può manifestarsi in 3 fasi:

- Infezione primaria
- Infezione latente
- Infezione attiva

I bacilli del *M. tuberculosis* inizialmente causano un'infezione primaria che solo raramente provoca malattia acuta. La maggior parte delle infezioni primarie, circa il 95%, è asintomatica ed è seguita da un'infezione latente che, 5-10% dei casi, si può riattivare manifestando la sintomatologia. L'infezione generalmente non è trasmissibile nella fase primaria e non è mai contagiosa nella fase latente.

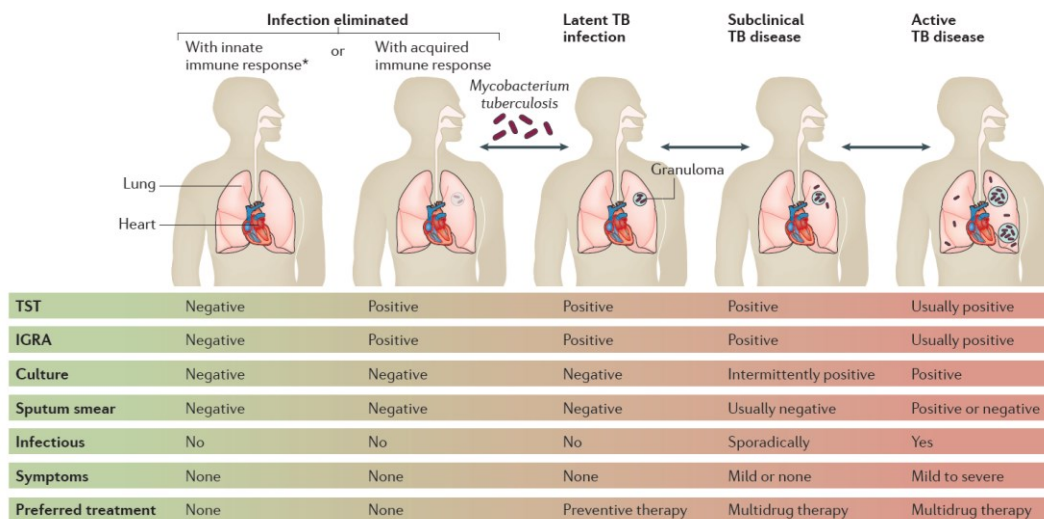


Figura 3 – Differenze evidenziabili tra le diverse forme cliniche della malattia tubercolare

### Infezione primaria

Per contrarre l'infezione è necessaria l'inalazione di particelle sufficientemente piccole in grado di attraversare le barriere di difesa delle vie respiratorie superiori sino alle diramazioni bronchiali più periferiche e agli alveoli polmonari. Le goccioline di dimensioni più grandi tendono a depositarsi nelle prime vie aeree e di solito non provocano infezione. Una volta depositati negli spazi alveolari dei polmoni, si innesca un processo infiammatorio, inizialmente di tipo «essudativo», con una prevalente componente vascolare, seguito da un intenso accumulo di macrofagi alveolari. I bacilli vengono fagocitati e in gran parte uccisi, con la conseguente «presentazione» di diversi antigeni micobatterici ai linfociti TH e l'innescamento della risposta immunitaria specifica cellulo-mediata, caratterizzata dalla presenza di linfociti CD4, che secernono citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$ ) e da linfociti CD8 ad azione citotossica. La contemporanea presenza di macrofagi «attivati», con un aumentato potere micobattericida, e di linfociti CD8 citotossici specifici, si riesce di norma a contenere l'infezione, con l'attivazione di un caratteristico processo infiammatorio di tipo granulomatoso. La lesione che ne deriva, definita «tubercolo» o granuloma, è rappresentata da un denso infiltrato di cellule mononucleate che circonda un insieme di cellule epitelioidi (macrofagi fittamente stipati) e cellule giganti multinucleate (cellule di Langerhans). Il tubercolo viene circoscritto da uno strato di tessuto fibrotico, prodotto da fibroblasti. La porzione centrale può andare incontro a necrosi caseosa (caseum, per l'aspetto simile al formaggio). Tale formazione è

riscontrabile all'esame istologico del tessuto polmonare; e si verifica sostanzialmente perché il sistema immunitario non è capace di eliminare l'agente patogeno. Per questo, la strategia più efficace per arginare l'infezione consiste nel creare un "involucro" di tessuto all'interno del quale il bacillo è isolato dal resto dell'organismo. I bacilli presenti nei granulomi possono essere uccisi, oppure possono rimanere latenti per lunghi periodi di tempo (mesi o addirittura anni). Il caseum costituisce un ambiente sfavorevole per la crescita dei micobatteri a seguito della bassa tensione di ossigeno. L'evoluzione del focolaio caseoso è variabile, in quanto può subire una trasformazione fibrotica e calcifica oppure può andare incontro a una trasformazione estremamente sfavorevole per l'ospite, ovvero la colliquazione che ripristina le condizioni ottimali per una ripresa della crescita microbica per l'aumento della tensione di ossigeno. Nel soggetto resistente, il processo infiammatorio rimane localizzato, coinvolgendo tutt'al più alcuni linfonodi mediastinici satelliti, con la formazione di quello che prende il nome di complesso primario. Non sempre però il complesso primario viene completamente e definitivamente sterilizzato. Al contrario in una percentuale difficilmente quantificabile la lesione granulomatosa iniziale, si traduce in un'infezione cronica paucibacillare, assolutamente asintomatica, ma con la persistenza di micobatteri, che possono rimanere vitali per lunghissimi periodi (decenni), anche se scarsamente metabolizzanti o addirittura in una sorta di letargo metabolico (infezione latente). Il persistente contenimento dell'infezione paucibacillare cronica del complesso primario richiede una sorveglianza immunologica continua ed il persistere di macrofagi attivati e di specifiche cellule linfocitarie CD4 e CD8 di memoria. Occasionalmente, una diminuita efficienza del sistema immunitario può portare alla «riattivazione» del complesso primario, con la ripresa della moltiplicazione dei micobatteri, la formazione di lesioni granulomatose multiple che confluiscono e che, in seguito alla necrosi e alla colliquazione della porzione centrale, possono svuotare il loro contenuto in circolo, con la diffusione dell'infezione in altre sedi polmonari o extra-polmonari, o nelle cavità bronchiali con l'emissione di espettorato bacillifero in grado di diffondere l'infezione ad altri soggetti.

### ***Malattia attiva***

Le persone sane che vengono infettate hanno circa il 5-10% di rischio nel corso della vita di sviluppare la malattia attiva, sebbene la percentuale vari in modo significativo in base

all'età e alla presenza di altri fattori di rischio. Nel 50-80% di coloro che sviluppano malattia attiva, la tubercolosi si riattiva entro i primi 2 anni, ma può avvenire anche decenni più tardi. Ogni organo inizialmente raggiunto per via ematogena può essere un sito di riattivazione, ma gli apici polmonari rappresentano quello più frequente, per la presenza di una maggiore tensione di ossigeno. Condizioni che compromettono l'immunità cellulare, essenziale per la difesa contro la tubercolosi, facilitano notevolmente la riattivazione, tra i fattori di rischio si evidenziano:

- co-infezione da HIV, che contribuisce ad un aumento annuo del rischio del 10%,
- diabete,
- cancro della testa e del collo,
- gastrectomia,
- intervento di bypass digiuno-ileale,
- malattia renale cronica dialisi-dipendente,
- perdita di peso significativa,
- farmaci immunosoppressori.

I pazienti che necessitano di terapia immunosoppressiva dopo trapianto di organo solido sono a più alto rischio. L'assunzione di immunosoppressori, come i corticosteroidi e gli inibitori del fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ) può causare una riattivazione. Il fumo di tabacco è un ulteriore fattore di rischio. In alcuni pazienti, la malattia attiva si sviluppa in seguito ad una re-infezione, che è il meccanismo più probabile nelle aree dove la tubercolosi è prevalente e i pazienti sono esposti a una grande inoculo di bacilli; mentre una riattivazione è più frequente in zone a bassa prevalenza. Le lesioni polmonari, causate da un meccanismo di ipersensibilità ritardata, sono tipicamente, ma non necessariamente, cavarie specialmente in pazienti immunodepressi. L'evoluzione della tubercolosi varia notevolmente, in base alla virulenza del microrganismo e al sistema immunitario dell'ospite: il decorso può essere rapido in membri di popolazioni isolate, come i nativi americani, che, a differenza di molti europei e dei loro discendenti americani, non hanno vissuto secoli di pressione selettiva per sviluppare l'immunità innata o naturale alla malattia. L'andamento è spesso più favorevole nelle popolazioni europee ed americane.

### ***Tubercolosi extra-polmonare***

La tubercolosi extra-polmonare (EPTB) è definita secondo i criteri di classificazione OMS come infezione da *M. tuberculosis* che colpisce i tessuti e gli organi al di fuori del parenchima polmonare, come risultato della diffusione ematogena e linfatica del micobatterio. Rappresenta tra il 20 e il 25% di tutti i casi di tubercolosi, nei pazienti sieropositivi, costituisce oltre il 50% di tutti i casi di tubercolosi. Tra le forme di tubercolosi extra-polmonare ricordiamo:

- **Tubercolosi miliare**

La tubercolosi miliare è la forma di tubercolosi più temuta, data la rapida diffusione linfo-ematogena da un focolaio polmonare o extra-polmonare, e la potenziale letalità. Da un punto di vista eziopatogenetico, l'alcolismo, la malnutrizione, le infezioni pediatriche, l'HIV, il diabete mellito, l'insufficienza renale grave, l'allotrapianto, le connettivopatie, la gravidanza ed il puerperio, la presenza di neoplasie e l'assunzione di corticosteroidi, immunosoppressori, citotossici ed immunomodulatori sono tutti eventi che compromettendo gravemente la risposta cellulo-mediata e predispongono al verificarsi della tubercolosi miliare. La tubercolosi miliare rappresenta circa l'1-2% di tutti i pazienti affetti da tubercolosi e circa il 10% di tutti i pazienti affetti da tubercolosi extra-polmonare. Durante il corso dell'infezione primaria, la diffusione ematogena trasporta i bacilli verso organi distanti con elevato flusso sanguigno, come fegato, milza, polmone, linfonodi, meningi, il midollo osseo e le ghiandole surrenali, dove, grazie alla sensibilizzazione dell'organismo, vengono arginati con la formazione di granulomi. Il termine "miliare" si riferisce proprio agli innumerevoli piccoli noduli sparsi come i semi del miglio. Le manifestazioni cliniche sono mutevoli e aspecifiche: spesso la malattia insorge con febbre persistente, brividi, debolezza, astenia e tosse. Di rado e soprattutto tra i soggetti anziani si ha una presentazione con apiressia ed astenia che mima il quadro di una lesione neoplastica (tubercolosi miliare criptica). La forma acuta diffusa è, invece, la più grave, e può comportare shock settico, sindrome da disfunzione a carico di più organi e sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS). Può interessare, quindi, non soltanto l'intero parenchima polmonare, ma molto spesso anche le meningi. La mortalità determinata dalla tubercolosi miliare è pari circa al 15-20%

tra i bambini ed al 25-30% negli adulti; fattore aggravante è il ritardo nella diagnosi e nella somministrazione della terapia. Nei pazienti con infezione da HIV la tubercolosi miliare manifesta alcune peculiarità epidemiologiche e cliniche: il 10% di coloro che presentano una malattia polmonare ed il 38% di coloro che hanno un interessamento extra-polmonare sviluppano un quadro miliare. Sintomi costituzionali maggiori e febbre sono caratteristici.

- **Tubercolosi Genitourinaria**

La tubercolosi genito-urinaria rappresenta circa il 6,5% di tutti i casi di EPT, ed è più comune negli uomini che nelle donne. È possibile, per via ematogena, la diffusione dei bacilli alla corticale del rene, dove rimangono silenti fino al raggiungimento della midollare. L'insorgenza della tubercolosi genitourinaria è spesso asintomatica, ma può dare i sintomi prevalentemente locali (disuria, ematuria e dolore) e la distruzione del tessuto può iniziare molto prima che venga posta la diagnosi. Non è accompagnata dallo sviluppo di ipertensione o di insufficienza renale, ma nel caso della nefrite interstiziale tubercolare si ha compromissione della funzionalità renale. La tubercolosi genitale maschile nell'80% dei casi è associata ad un coinvolgimento renale. L'infezione si diffonde dal rene alla prostata, alle vescicole seminali ed ai testicoli. Sono comuni il riscontro di una massa scrotale e lo sviluppo di persistente oligospermia. La diagnosi è molto spesso chirurgica e la risposta alla terapia ottima. Nella donna, invece, la tubercolosi genitale inizia con un focolaio linfo-ematogeno a livello dell'endosalpinge, può raggiungere l'endometrio (50%), le ovaie (30%), la cervice uterina (10%) e la vagina (1%). Le pazienti lamentano infertilità, disordini mestruali ed addominalgie, rari sono i sintomi sistemici. La diagnosi è raggiunta attraverso l'esame istologico del tessuto rimosso per via chirurgica. La risposta alla terapia antitubercolare è eccellente.

- **Tubercolosi Cerebrale**

Nonostante la disponibilità di un trattamento efficace, la meningite tubercolare ha un ruolo devastante sia nei paesi in via di sviluppo che in quelli industrializzati; nonostante sia tra le forme meno frequenti (5-15%). Si osserva spesso nei bambini, ma anche negli adulti, soprattutto se presenti fattori di rischio: distrofia, alcolismo, diabete mellito e deficit immunitari, tra cui una co-infezione da HIV.

Si tratta di una forma grave della malattia che comporta elevata morbilità e mortalità: il 25% dei pazienti può andare incontro a diverse complicazioni, mentre tra il 15 e il 40% può morire nonostante l'inizio del trattamento. La meningite tubercolare si presenta come conseguenza della presenza di focolai sub-corticali e meningei a partire dai quali i bacilli raggiungono lo spazio sub-aracnoideo. La rottura potrebbe fare seguito ad un trauma cranico o potrebbe essere associata ad una compromissione immunitaria. Si forma, quindi, un denso essudato che circonda le arterie ed i nervi cranici, ostruendo il flusso del liquor: da qui lo sviluppo di idrocefalo. Molto grave è l'insorgenza di vasculite a livello del circolo di Willis e dei rami perforanti dell'arteria cerebrale media: ne risultano emiplegia e quadriplegia. La meningite tubercolare presenta tipicamente un corso insidioso subacuto, inizialmente caratterizzato da sintomi, quali: cefalea, malessere, debolezza e febbre intermittente, che progredisce, dopo 2-3 settimane, manifestando febbre continua, vomito, alterazione dello stato di coscienza, meningismo e segni neurologici focali; possono condurre ad un'improvvisa meningite e coma. Possono anche essere presenti vari gradi di nervo oculomotore (III, IV e V) e segni del tratto lungo. La morte può sopraggiungere entro cinque-otto settimane dall'inizio della malattia.

- **Pericardite Tubercolare**

L'infezione pericardica da *M. tuberculosis* può svilupparsi secondariamente all'estensione dell'infezione dai polmoni, dai linfonodi mediastinici, dalla colonna vertebrale o dallo sterno, oppure tramite diffusione miliare. In alcuni casi la letalità di questa forma d'infezione raggiunge il 40%. La malattia ha un esordio insidioso, manifestandosi con febbre, malessere e debolezza. I pazienti possono presentare sfregamenti pericardici, indistinto dolore toracico o cardiomegalia alla radiografia. Nel 20% dei casi compare in maniera acuta e in alcuni casi la prima manifestazione è quella del tamponamento cardiaco o pericardite costruttiva. Dispnea, tosse e perdita di peso sono i sintomi più comuni. Dolore toracico, ortopnea ed edemi declivi si osservano nel 40-70% dei pazienti. Il versamento pericardico della tubercolosi è tipicamente essudativo e caratterizzato da alto contenuto proteico e aumento del numero di leucociti, con una prevalenza di linfociti e monociti.



- **Pleurite Tuberculare**

È classificata fra le tubercolosi extra-polmonari, nonostante l'intimo rapporto anatomico tra polmoni e pleura, ed è una forma molto comune che rappresenta quasi il 20% di tutti i casi, tanto che il *M. tuberculosis* è tra le principali cause di pleurite. È causata da una serie di reazioni di ipersensibilità contro gli antigeni micobatterici localizzata nello spazio pleurico, con possibile versamento pleurico come conseguenza della rottura di un focolaio polmonare, sia parenchimale che linfonodale. Il coinvolgimento pleurico si presenta generalmente come una malattia acuta e la durata dei sintomi varia da pochi giorni a qualche settimana. Si manifesta con dolore toracico pleurico, tosse non produttiva, dispnea e febbre in molti pazienti; a volte l'esordio è sfumato. Le lesioni pleuriche tubercolari sono tipicamente unilaterali (tranne nelle forme associate a tubercolosi miliare) e auto-limitate, si risolvono spontaneamente nell'arco di 2-4 mesi senza trattamento; la terapia non affretta la risoluzione, ma impedisce lo sviluppo di malattia attiva in altre regioni dell'organismo. Tuttavia possono comportare lo sviluppo di empiema quando una cavità di grandi dimensioni si rompe nello spazio pleurico, condizione che, previa disponibilità di farmaci era rapidamente fatale.

- **Linfadenite Tuberculare**

È una delle forme più comuni di EPTB (30-40%) e colpisce più frequentemente bambini e giovani adulti. Può essere conseguenza sia di un'infezione primaria, che di una riattivazione. La forma più comune è la linfoadenopatia cervicale (63-77%)<sup>6</sup>. Si pensa che l'infezione sia dovuta alla diffusione contigua da vasi linfatici intratoracici o da infezione a livello delle tonsille e delle adenoidi. La linfoadenite cervicale tubercolare è caratterizzata da un progressivo rigonfiamento dei linfonodi interessati, con consistenza rigida e indolori. Nei casi più avanzati, i linfonodi possono diventare infiammati e dolenti; la pelle sovrastante può rompersi, causando una fistola drenante. Di solito non implica un coinvolgimento sistemico. Può eventualmente presentare necrosi e produrre sintomi infiammatori con ulcerazione, formazione di fistole e scrofoli. Può colpire, comunque, anche altre sedi, come le catene sopra-clavicolarie posteriori, linfonodi ascellari, toracici e addominali<sup>6</sup>. I linfonodi mediastinici sono anche comunemente ingranditi, come parte della malattia polmonare primaria. Il gonfiore dei linfonodi in questa

posizione può comprimere le strutture vicine e produrre ostruzione bronchiale o esofagea tracheale.

#### ▪ **Tubercolosi delle ossa e delle articolazioni**

Rappresenta l'11% delle forme di EPTB. Può colpire qualsiasi tipo di ossa, ma le articolazioni che sostengono il carico sono le più comunemente coinvolte. Infatti il 50% dei casi di TB osteoarticolare è rappresentato dal morbo di Pott, o spondilite tubercolare<sup>6</sup>. Nei paesi in cui la tubercolosi è endemica il morbo di Pott colpisce soprattutto i giovani adulti, mentre nelle nazioni industrializzate è una patologia dell'anziano. Rappresenta l'infezione della colonna, come risultato di una diffusione ematogena, per contiguità o diffusione linfatica a partire da una malattia pleurica<sup>2</sup>. L'infezione inizia generalmente con l'infiammazione dell'aspetto anteriore dei corpi vertebrali, da qui diffonde dal legamento anteriore al disco e ai corpi adiacenti, con un restringimento dello spazio discale. Può diffondersi ai tessuti molli adiacenti con la formazione di ascessi paravertebrali che interessano l'aspetto posteriore dei corpi vertebrali, e possono coinvolgere il midollo spinale, che è a rischio di compressione. La malattia di Pott più comunemente interessa la regione toracica più bassa in pazienti più giovani e la regione lombare superiore in pazienti anziani<sup>6</sup>. Il sintomo più comune è il dolore locale progressivo o costante delle ossa interessate e artrite subacuta o cronica (generalmente mono-articolare). Nel morbo di Pott, la compressione del midollo spinale produce deficit neurologici, inclusa la paraplegia; l'edema paravertebrale può derivare da un ascesso<sup>[4]</sup>. La concomitante infezione da TBC in altre località è presente tra il 20 e il 40% di tutti i casi<sup>[6]</sup>.

#### ▪ **Tubercolosi Gastrointestinale**

L'enterite tubercolare può coinvolgere qualsiasi aspetto del tratto gastrointestinale, anche se la regione ileo-cecale è il sito più comune. La patogenesi può essere attribuita a quattro meccanismi:

- ingestione di latte o alimenti contaminati in caso di infezione da *M. bovis*,
- ingestione di espettorato infetto,
- diffusione ematica da tubercolosi polmonare o miliare attiva,
- diffusione contigua da organi adiacenti.

Il bacillo penetra nella mucosa e si localizza nel tessuto linfoide della

sottomucosa, con formazione del tubercolo epitelioido. Le lesioni intestinali possono essere ulcerative (più comuni, con ulcerazione della mucosa), ipertrofiche o ulcero-ipertrofiche. Le ulcere sono, di norma, piccole e multiple con margini irregolari e mucosa circostante ispessita; con la progressione della malattia si ha la formazione di granulomi, necrosi caseosa e cicatrizzazione. I sintomi e i segni di enterite tubercolare sono relativamente vaghi e non specifici: il dolore addominale cronico non specifico è il sintomo più comune che si verifica nell'80-90 % dei pazienti. Una massa addominale palpabile è presente in alcuni pazienti (25-50%). Anoressia, stanchezza, febbre, sudorazione notturna, perdita di peso, diarrea, stitichezza, o sangue nelle feci possono essere presenti. Fistola e stenosi intestinale possono verificarsi, e quindi la diagnosi differenziale con la malattia di Crohn è importante. L'ostruzione intestinale è la complicazione più comune e può essere dovuta a stenosi progressiva o aderenze. La peritonite tubercolare, piuttosto rara, si verifica come conseguenza della riattivazione di focolai latenti nel peritoneo a seguito della diffusione ematogena dell'infezione o della diffusione contigua da focolai adiacenti (come la TBC genitourinaria o la TBC intestinale). Il rischio è aumentato nei pazienti con cirrosi, diabete mellito, infezione da HIV e nei pazienti sottoposti a dialisi peritoneale ambulatoriale continua.

- **Laringite Tubercolare**

Nell'epoca pre-antibiotica la tubercolosi laringea si sviluppava in un terzo dei pazienti che poi sarebbero morti per la malattia polmonare. Di solito comporta lo sviluppo di lesioni, soprattutto masse, ulcere o noduli nella laringe e corde vocali, a volte scambiate per neoplasie laringee. La manifestazione clinica più comune è la disfonia, ma si può anche avere tosse, stridore, ematite, disfagia, odinofagia e otalgia. Di solito è associata a tubercolosi polmonare, ed è quindi una forma altamente bacillifera e contagiosa della malattia.

### ***Prognosi***

Nei pazienti immunocompetenti con tubercolosi polmonare farmaco-sensibile una terapia appropriata è generalmente curativa, se completata. Nonostante ciò, la tubercolosi causa o contribuisce al decesso nel 10% circa dei casi, spesso in pazienti debilitati per altre

ragioni. La tubercolosi disseminata e la meningite tubercolare possono essere fatali fino al 25% dei casi nonostante una terapia ottimale. La tubercolosi è molto più aggressiva nei pazienti immunocompromessi e, se non trattata adeguatamente e tempestivamente, può essere fatale in meno di 2 mesi dall'inizio dei sintomi, in particolare nei casi di tubercolosi multi-resistente (MDR). I risultati peggiori sono per i pazienti con tubercolosi a multi-resistenza estesa (XDR), perché ci sono pochi farmaci efficaci.

### ***Trattamento***

La maggior parte dei pazienti affetti da tubercolosi può essere trattata ambulatorialmente una volta istruiti su come prevenire la trasmissione:

- stare a casa,
- evitare visite (eccetto per familiari precedentemente esposti),
- tossire coprendosi con un fazzoletto o con un gomito.

Sono necessarie precauzioni fino a che il trattamento farmacologico non riduce significativamente la possibilità di contagio. Per i pazienti con comprovata farmaco-sensibilità o tubercolosi multi-resistente, le precauzioni sono mantenute sino al raggiungimento di una risposta clinica alla terapia (in genere, da 1 a 2 settimane). Tuttavia, per le forme XDR-TB la risposta al trattamento può essere più lenta, e le conseguenze di una trasmissione ancora maggiori; quindi, una risposta più convincente alla terapia è necessaria per terminare le precauzioni. Con un idoneo trattamento della tubercolosi è possibile:

- evitare casi di decesso causati dalla malattia,
- guarire le persone ammalate,
- impedire la trasmissione di micobatteri da soggetti ammalati a soggetti sani,
- evitare l'insorgenza di resistenze che potrebbero determinare il fallimento del trattamento e una recidiva della malattia.

Il trattamento di pazienti contagiosi e perciò la misura più efficace e la migliore profilassi antitubercolare anche sotto l'aspetto della salute pubblica. Lo scopo della strategia del trattamento della tubercolosi auspicata dall'OMS consiste nel guarire nel mondo l'85% dei casi di tubercolosi con espettorato positivo. In caso di trattamento non idoneo (es. dosaggio insufficiente o errate combinazioni di farmaci), agenti patogeni resistenti

naturalmente ai farmaci antitubercolari possono mutare in forme resistenti a numerosi antibiotici.

### ***Tubercolosi latente***

La gestione dell'infezione da tubercolosi latente (LTBI) nelle popolazioni più a rischio di sviluppare la malattia attiva rimane un'attività critica per interrompere la trasmissione di *M. tuberculosis*, come riportato nel documento "The End TB Strategy" dell'OMS [2]. L'OMS definisce l'infezione tubercolare latente (LTBI) come uno stato di risposta immunitaria, persistente, alla stimolazione da parte degli antigeni di *M. tuberculosis*, senza evidenza di malattia attiva clinicamente manifestata. Si stima che un terzo della popolazione mondiale sia affetto da LTBI. La durata della latenza è molto variabile, si può avere sviluppo di malattia attiva in un futuro prossimo o remoto, in seguito ad un processo di "riattivazione della tubercolosi", che si osserva nel 5-10 % dei casi, soprattutto nei primi 2-5 anni dopo l'infezione<sup>14</sup>. La riattivazione è il processo attraverso il quale si passa da un'infezione latente subclinica alla tubercolosi attiva. Il rischio di riattivazione in individui immunocompetenti con LTBI è stimato tra il 5% e il 15%, ma può essere aumentato in presenza di co-morbidità. Il rischio di tubercolosi attiva dopo l'infezione dipende da diversi fattori, il più importante dei quali è lo stato immunologico. Il fattore di rischio più potente è rappresentato dall'infezione da HIV. Altre co-morbidità associate ad un rischio più o meno elevato sono, ad esempio, l'insufficienza renale cronica che richiede emodialisi, trapiantati con assunzione di farmaci immunosoppressori, silicosi, trattamento con inibitori del TNF-alfa o glucocorticoidi, diabete, recente infezione in bambini di età inferiore ai 4 anni, alcol o fumo di sigarette, obesità e malnutrizione. Una caratteristica comune tra questi gruppi che comporta ad un aumento del rischio di sviluppare riattivazione, è l'immunosoppressione. I soggetti con LTBI sono infettati dal bacillo tubercolare, ma, non manifestando ancora la malattia attiva, non possono trasmettere l'infezione. Nonostante questo rappresentano un serbatoio importante per i nuovi casi di TB attiva. Per questo motivo è fondamentale somministrare il trattamento preventivo, ottenendo importanti benefici sia per l'individuo che per la comunità.

Secondo le nuove linee guida dell'OMS [13] per la gestione delle LTBI si deve considerare un'ampia gamma di fattori, tra cui la probabilità di progressione verso la

tubercolosi attiva in specifici gruppi a rischio, l'epidemiologia della tubercolosi, la disponibilità di risorse e la probabilità di un ampio impatto sulla salute pubblica.

Le opzioni di trattamento attualmente disponibili consentono di ridurre dal 60 al 90% il rischio di sviluppare tubercolosi attiva. La gestione dei casi di LTBI può infatti contribuire all'eliminazione della tubercolosi, in particolare nei paesi a bassa incidenza, in cui un'ampia percentuale di casi è dovuta alla riattivazione di un'infezione latente.

Poiché si riscontrano problemi di sicurezza, legati principalmente allo sviluppo di epatotossicità, si rende necessario il monitoraggio clinico regolare delle persone che ricevono il trattamento per LTBI con una visita mensile. I seguenti regimi sono raccomandati dall'OMS per il trattamento di LTBI:

- isoniazide giornaliera di 6 mesi o 9 mesi,
- 3 mesi di rifapentina più isoniazide settimanale,
- isoniazide a 3 o 4 mesi più rifampicina al giorno,
- rifampicina di 3 o 4 mesi al giorno.

Queste nuove linee guida (2018), emanate in sostituzione dei precedenti documenti politici dell'OMS (*Guidelines on the management of latent tuberculosis infection, WHO 2015*), definiscono i criteri per la gestione di LTBI in soggetti HIV positivi, nei contatti familiari di persone con tubercolosi attiva, e altri gruppi ad aumentato rischio di sviluppare la TBC, che, rappresentando ottimi candidati per il trattamento, dovrebbero essere testati per LTBI. Lo scopo del documento è fornire la base per lo sviluppo di linee guida nazionali per la gestione delle LTBI, adattati all'epidemiologia nazionale e locale della tubercolosi, alla disponibilità di risorse, le infrastrutture sanitarie e gli altri determinanti nazionali e locali.

## 4. DIAGNOSI DI LABORATORIO DELL'INFEZIONE TUBERCOLARE

### ***4.1. Diagnosi microscopica ed esame colturale***

La diagnosi di tubercolosi attiva si basa sull'individuazione di micobatteri del complesso *M. tuberculosis complex* in un campione clinico. Le indagini microbiologiche sono in grado di fornire la certezza o il livello di maggior probabilità diagnostica, tanto da costituire il riferimento cardine per la condotta della terapia. La diagnosi si basa sul reperto di bacilli tubercolari nel campione clinico, la cui ricerca viene eseguita con esame microscopico e colturale. L'esame microscopico e l'esame colturale rappresentano il *Gold Standard* degli esami di laboratorio per la conferma di tubercolosi. Infatti, devono essere eseguiti sempre per valutare l'infettività del paziente, confermare o meno la presenza di micobatteri vitali e permettere l'allestimento delle prove di farmacosenibilità "in vitro". L'esame microscopico è un test rapido, ma scarsamente sensibile; inoltre la positività può essere dovuta a qualsiasi micobatterio e non necessariamente a *M. tuberculosis complex*. Se positivo è richiesta l'esecuzione di test di amplificazione genica direttamente su campione per discriminare, in tempi brevi, micobatteri tubercolari dai non tubercolari. L'esame colturale richiede tempi più lunghi, ma è caratterizzato da una maggiore sensibilità, soprattutto se eseguito, in parallelo, su terreni solidi e terreni liquidi. In caso di crescita di micobatteri in coltura, è necessario identificare la specie, se l'isolato è *M. tuberculosis complex* deve essere eseguito l'antibiogramma, per verificare la sensibilità ai farmaci anti-tubercolari <sup>[14]</sup>.

### ***Raccolta, conservazione e invio dei campioni per l'esame microscopico***

Per la diagnosi di tubercolosi polmonare, il campione più comunemente utilizzato è l'espettorato. Se i pazienti non riescono a produrre espettorato spontaneo, lo si può indurre con un aerosol con soluzione salina ipertonica (espettorato indotto). In caso di insuccesso, si possono eseguire lavaggi bronchiali tramite broncoscopia a fibre ottiche, broncoaspirato, o aspirato gastrico, soprattutto per i bambini che non riescono ad espettorare. Le linee guida nazionali <sup>[15]</sup> forniscono informazioni sul numero di campioni consigliati; i campioni del primo mattino hanno la più alta resa di AFB (Acid Fast

Bacilli), ma, è ora dimostrato, come sia possibile raccogliere buoni campioni diagnostici in qualsiasi momento. Non è consigliabile eseguire microscopia a striscio da sangue o campioni molto ematici a causa della bassa sensibilità della procedura. Si sconsiglia inoltre di eseguire di routine la microscopia a striscio da campioni di urina a causa del frequente rilevamento di micobatteri saprofiti che colonizzano il tratto urogenitale.

Per la raccolta usare contenitori in plastica a bocca larga, sterili e monouso, con tappo a vite, senza aggiunta di sostanze fissanti o conservanti. In alternativa è possibile utilizzare provette coniche sterili e monouso (capacità 50ml). I tamponi NON sono idonei per la raccolta dei materiali biologici. La raccolta, dove e se possibile, deve essere asettica, per minimizzare il più possibile le contaminazioni con il microbiota residente. È importante raccogliere una quantità di materiale biologico sufficiente per i test richiesti. Per evitare l'essiccamento di campioni di piccole dimensioni (es.: frammenti biotici) è consigliabile aggiungere alcune gocce di soluzione fisiologica sterile nel contenitore. Nel caso di sospetta tubercolosi a localizzazione polmonare devono essere inviati 3 campioni di espettorato spontaneo (almeno 3-5 ml), raccolti di primo mattino in 3 giorni, possibilmente, consecutivi. Al fine di ottenere un campione adeguato per qualità e quantità è preferibile che il paziente sia assistito da personale qualificato durante la raccolta. L'espettorato deve provenire dalle basse vie aeree; non deve essere costituito da saliva o contaminato da secrezioni naso-faringee. Se i campioni sono idonei, non c'è indicazione all'invio di ulteriore materiale. Per la raccolta di un campione ottimale i pazienti devono ricevere istruzioni chiare per quanto riguarda la corretta procedura di del campione di espettorato per la diagnosi di TB. Per i pazienti in trattamento, i campioni devono essere raccolti a intervalli specificati in conformità con le linee guida. I campioni di espettorato dovrebbero apparire spessi e mucosi o chiari, ma con granuli purulenti. Il colore varia dal bianco opaco al verde. I campioni con tracce di sangue appariranno rossastri o marroni. Da notare la non adeguatezza di campioni di saliva chiara o secrezione nasale per la diagnosi di tubercolosi. In caso di impossibilità ad ottenere campioni idonei di espettorato (es. se il paziente ha difficoltà ad espettorare), è possibile inviare:

- 3 campioni di espettorato indotto. Si induce l'espettorazione facendo inspirare, lentamente e profondamente, al paziente un aerosol di soluzione salina ipertonica, per 15-20 minuti. Nonostante questa modalità di raccolta sia poco utilizzata nella pratica clinica



in Italia, numerosi studi hanno dimostrato che ha una resa diagnostica superiore all'aspirato gastrico e pari, o addirittura superiore, a quella dei materiali raccolti mediante broncoscopia,

- 3 campioni di aspirato gastrico, prelevati in 3 giorni consecutivi. Metodo riservato ai casi in cui il paziente non sia in grado di espettorare spontaneamente o dopo induzione, soprattutto nei bambini. Viene eseguito al mattino, quando il paziente è a digiuno da almeno 8 ore, utilizzando 20-25 ml di acqua distillata sterile. L'acidità del materiale gastrico prelevato deve essere neutralizzata aggiungendo carbonato di sodio (100 mg),
- 1 campione di lavaggio bronco alveolare o bronco aspirato.

Sia l'induzione dell'espettorato che la broncoscopia implicano un certo rischio di infezione per il personale medico, essendo procedure che generano aerosol infettivi; pertanto devono essere eseguite solo in casi selezionati, ovviamente con l'utilizzo di adeguati dispositivi di protezione (es. camera con pressione negativa e adeguato ricambio dell'aria, filtri respiratori).

Nel caso di sospetta tubercolosi a localizzazione extra-polmonare, piuttosto frequente nei pazienti affetti da AIDS, può essere necessaria l'esecuzione dell'esame sui tessuti o fluidi corporei nei siti interessati dall'infezione:

- linfonodi,
- pus,
- biopsie,
- liquido pleurico,
- liquido peritoneale,
- liquido pericardico,
- liquido articolare,
- liquor,
- urine, richiesta solo nei casi di sospetta localizzazione genitourinaria (3 campioni di urina in 3 giorni diversi),
- sangue.

Nel caso di secrezioni purulente scarse è possibile la raccolta con tampone sterile (senza terreno di trasporto), da stemperare, immediatamente dopo il prelievo, in soluzione fisiologica.

### ***Conservazione e trasporto***

I campioni dovrebbero essere processati entro poche ore dall'arrivo in laboratorio; pur essendo ormai accertato che i micobatteri conservano la loro vitalità a +4 °C per un massimo di 2 giorni, è raccomandabile processare il campione entro 48 ore. Fino al trasferimento in laboratorio tutti i campioni devono essere conservati in frigorifero, ma non congelati, perché ciò potrebbe diminuire la carica dei micobatteri vitali, ad eccezione del sangue (emoculture) che deve essere conservato a temperatura ambiente. Il campione dovrebbe pervenire in laboratorio *nel tempo più breve possibile*, per evitare una eccessiva crescita della flora microbica residente.

### ***Idoneità dei campioni***

Tutti i campioni non idonei o pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere accettati, è importante segnalare al clinico i motivi del rifiuto. Tali campioni dovrebbero essere tuttavia conservati per almeno 2 giorni per fornire al clinico l'opportunità di richiederne, in via eccezionale, il trattamento nel caso di impossibilità di raccogliere un campione adeguato.

L'esame batterioscopico diretto dei micobatteri è un test diagnostico rapido ed economico, che rappresenta un'importante supporto alla diagnosi e all'identificazione di infezioni causate da *Mycobacterium tuberculosis*. Viene eseguito preparando uno striscio del materiale biologico su di un vetrino perfettamente pulito e ben identificato dove si esegue una colorazione specifica basata sul principio dell'alcool-acido resistenza.

### ***Preparazione dello striscio***

Nonostante la preparazione dello striscio per il rilevamento bacilli alcol-acido-resistenti (BAAR) sia una procedura relativamente sicura in quanto a produzione di aerosol infetto, si raccomanda comunque l'esecuzione utilizzando una cappa di sicurezza biologica di classe I o IIB. Se lo striscio viene preparato dopo la centrifugazione del campione (striscio concentrato), il supporto della centrifuga deve essere aperto all'interno di una cappa di sicurezza biologica. La colorazione per la ricerca di bacilli alcol-acido-resistenti (BAAR), oltre che sui campioni clinici di soggetti con sospetta infezione micobatterica, può essere eseguita su colture con presenza di crescita. È possibile effettuare la ricerca microscopica su qualsiasi materiale biologico con la sola eccezione del sangue, in cui

l'eventuale carica batterica è solitamente inferiore alla soglia di sensibilità del metodo. Sui campioni clinici l'esame microscopico eseguito direttamente, cioè senza concentrazione mediante centrifugazione, è sconsigliato, dal momento che riduce ulteriormente la già bassa sensibilità del test <sup>[16]</sup>. Per l'esecuzione dello striscio è fondamentale l'utilizzo di vetrini ben sgrassati, contrassegnati, usando una matita, con l'identificativo del campione sull'estremità smerigliata <sup>[15]</sup>. Per lo striscio preparato direttamente da un campione fresco (senza preventiva centrifugazione), è bene utilizzare un'ansa monouso, per selezionare e raccogliere il materiale nelle aree necrotiche-purulente di espettorato. Preparare lo striscio trasferendo una porzione del campione sul vetrino da distribuire in una forma ovale al centro, spostando il materiale con movimenti concentrici o a spirale, per ottenere uno striscio di, approssimativamente, 2–3 cm di lunghezza e 1–2 cm di larghezza, che consentirà di contare 100–150 campi in un'unica lunghezza. La diffusione accurata del campione è molto importante, soprattutto nel caso di materiale spesso o purulento; non dovrebbe essere né troppo spesso né troppo sottile per consentire un'osservazione ottimale. Per i pellet risospesi (dopo la centrifugazione per 15' a 3000 giri) applicare su vetrino 1-2 gocce di sedimento utilizzando un'ansa o una pipetta. In caso si parta da un campione di liquido cefalo-rachidiano, depositare al centro del vetrino una goccia di pellet e lasciar asciugare all'aria. Ripetere l'operazione 4 volte. Lasciare asciugare completamente lo striscio all'aria, a temperatura ambiente, all'interno della cappa di sicurezza biologica. Per il fissaggio dei vetrini è possibile effettuare:

- 3–4 passaggi, per circa 2–3 secondi ognuno, sulla fiamma ossidante (blu o incolore) di un becco Bunsen. Non riscaldare il vetrino troppo a lungo e non tenerlo fermo sulla fiamma altrimenti si brucerà,
- porre i vetrini per almeno due ore su piastra riscaldata (65–75 ° C)
- immergere i vetrini in metanolo assoluto per almeno 1'; è bene ricordare che l'utilizzo, in questa metodica, di una vaschetta per più vetrini diversi possa contribuire a cross-contaminazioni.

### ***Colorazione***

I micobatteri sono microrganismi difficilmente colorabili a causa dell'elevato contenuto di lipidi complessi nella parete batterica.

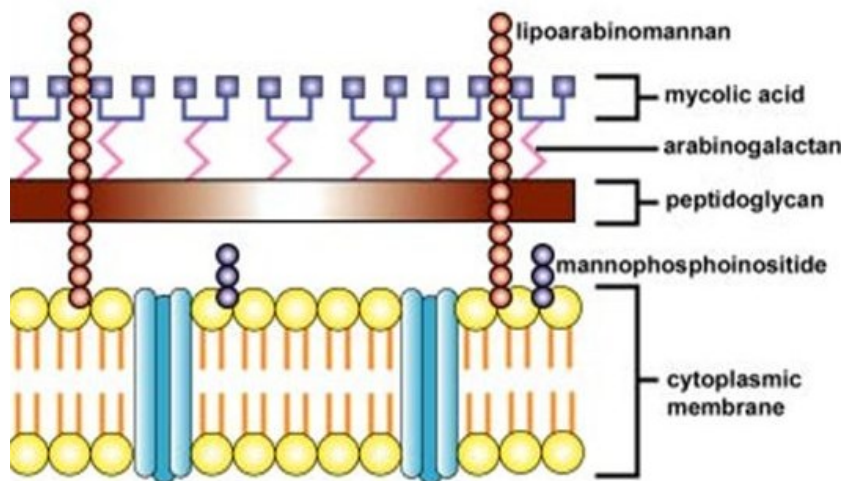


Figura 4 – Rappresentazione schematica della parete dei micobatteri

Questa peculiarità impedisce l'accesso ai comuni coloranti a base di anilina, tanto che i micobatteri si colorano poco o per nulla con la colorazione di Gram, mentre sono in grado di legare stabilmente alcuni coloranti in soluzione fenolica, come la carbol-fucsina, o fluorocromi, trattenendoli dopo un trattamento di decolorazione con una miscela di acido forte e alcol. Tale proprietà, conosciuta come alcol-acido-resistenza, definisce questi microrganismi come bacilli alcol-acido-resistenti (BAAR). I Micobatteri possono essere elettivamente colorati mediante:

- Metodo Ziehl-Neelsen,
- Metodo Kinyoun (colorazione “a freddo”),
- Colorazione con fluorocromi (auramina o auramina-rodamina).

### ***Colorazione di Ziehl-Neelsen (carbol-fucsina a caldo)***<sup>[15]</sup>

Reagenti utilizzati:

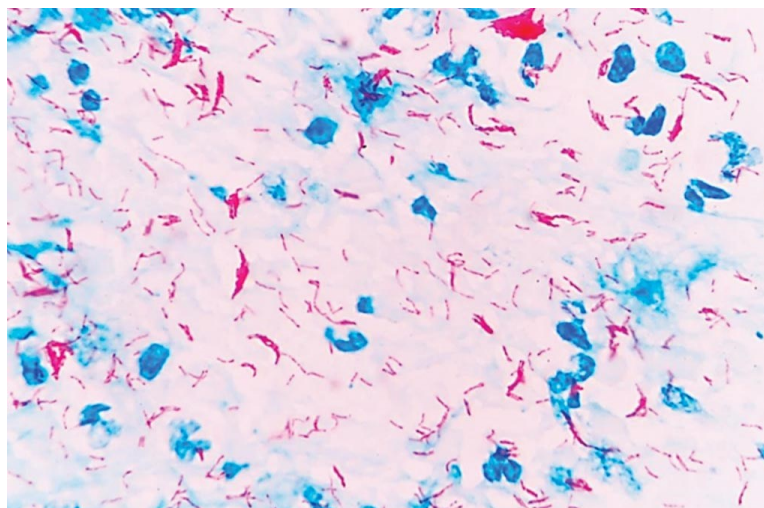
- Reagente per carbol-fucsina: sulla base di parametri, quali purezza e solubilità, calcolare le quantità necessarie per la preparazione di una soluzione 0,3% di carbol-fucsina. Preparare una soluzione, pesando 3g di fucsina di base in polvere disciolti in 100 mL di etanolo al 95%, poi addizionata di 10 volumi di soluzione di fenolo al 5%
- decolorante; si utilizzano 2 soluzioni:
  - una soluzione di acido solforico al 25%: aggiungere lentamente 3 mL di acido cloridrico concentrato a 97 mL di etanolo al 95%,
  - una soluzione al 3% di HCl in etanolo 95%

- colorante di contrasto: sciogliere 0,3 g di polvere di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata.

I reagenti, una volta pronti, vengono riposti in appositi contenitori, etichettati (nome reagente, concentrazione, data di preparazione). Conservare lontano dalla luce solare diretta, o in contenitori marroni o in un armadietto. Procedimento<sup>[15]</sup>:

- coprire l'intera superficie del vetrino con carbolfucsina di Ziehl. Scaldare lentamente, fino alla formazione dei primi vapori, sulla fiamma di un becco Bunsen (fase in cui si possono creare dei pericolosi aerosol se non si è provveduto alla sterilizzazione dello striscio). Lasciare agire il colorante per 5 minuti affinché penetri adeguatamente nella parete cellulare

- lavare il vetrino con acqua,
- decolorare con la miscela acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 secondi, fino a quando nel liquido di lavaggio non vi è più traccia di colorante,
- sciacquare il vetrino con acqua di fonte,
- colorazione di contrasto con blu di metilene per almeno 30 secondi,
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini,
- asciugare all'aria.



*Figura 5 – Micobatteri osservati al microscopio ottico. Si nota la caratteristica colorazione fucsia data dalla carbolfucsina, che li rende ben visibili e differenziati dallo sfondo bluastro*

#### ***Colorazione di Kinyoun (carbolfucsina a freddo)***<sup>[16]</sup>

La colorazione di Kinyoun è molto simile a quella di Ziehl-Neelsen con la differenza

sostanziale che non avviene a caldo. Reagenti utilizzati:

- Carbofucsina di Kinyoun: soluzione contenente 4 g di polvere di fucsina basica in 20 ml di etanolo al 95%; con aggiunta di 100 ml di acqua distillata in cui sono stati sciolti a caldo 9 g di fenolo in cristalli,
- decolorante: aggiungere lentamente 3 mL di acido cloridrico concentrato a 97 ml di etanolo al 95%,
- colorante di contrasto: sciogliere 0,3 g di blu di metilene in 100 ml di acqua distillata.

Procedimento:

- coprire il vetrino con carbofucsina di Kinyoun. Colorare per 5 minuti,
- lavaggio con acqua di fonte,
- decolorazione con la miscela acido-alcol in due o più passaggi della durata di 30 secondi, fino a quando nel liquido di lavaggio non vi sia più traccia di colorante,
- lavaggio con acqua di fonte,
- colorazione con blu di metilene per almeno 30 secondi,
- lavaggio con acqua di fonte e scolatura dei vetrini,
- asciugatura all'aria.

La colorazione di Ziehl-Neelsen e la colorazione di Kinyoun permettono una ottima definizione della morfologia batterica. All'esame microscopico, con ingrandimento di 1000x ad immersione i microrganismi acido-alcol resistenti appaiono di colore rosso, su uno sfondo di colore azzurro-blu. I micobatteri assumono, spesso, una colorazione rossa discontinua con alternanza nella stessa cellula di zone più o meno colorate, soprattutto in corrispondenza di alcune granulazioni dette granuli di Much<sup>[13]</sup>. Tali elementi sembrano essere accumuli di materiale di riserva e sono evidenziabili anche con la colorazione di Gram, in cui i micobatteri mantengono la colorazione violetta soprattutto in corrispondenza di suddetti granuli.

### ***Colorazione fluorocromica con Auramina***<sup>[15]</sup>

La colorazione con auramina-rodamina è basata sullo stesso principio delle precedenti: - il colorante principale è una miscela di auramina-rodamina, con affinità per gli acidi micolici, di cui la parete batterica è ricca. Il fluorocromo resiste alla sua eliminazione dopo trattamento con una soluzione mista di acido e alcool. Reagenti utilizzati:

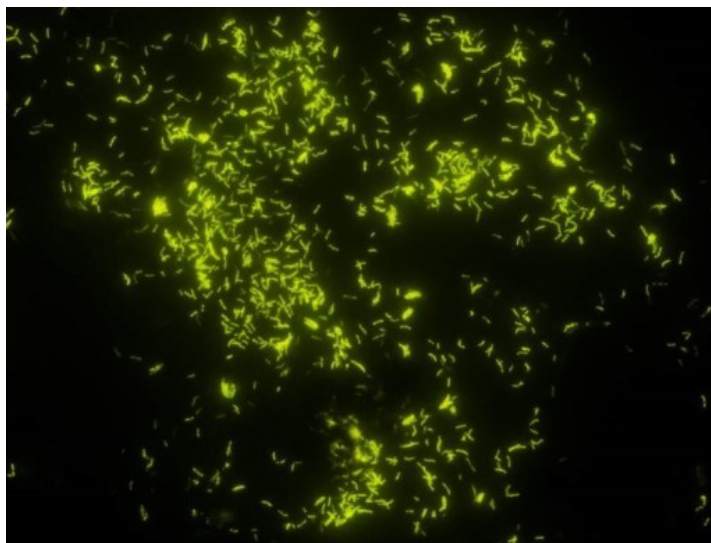
- auramina:

- soluzione 1 contenente 0,1 g di auramina O basica in 10 mL di etanolo al 95%,
  - soluzione 2 con 87 mL di acqua distillata nella quale sciogliere 3 g di fenolo in cristalli.
- Mescolare le due soluzioni e conservare in un flacone scuro e ben chiuso
- decolorante: 0,5 mL di acido cloridrico concentrato solubilizzati in 100 mL di etanolo al 70%,
  - colorante di contrasto, si possono utilizzare 2 soluzioni:
    - permanganato di potassio (KMnO<sub>4</sub>): sciogliere 0,5 g di permanganato di potassio in 100 mL di acqua distillata,
    - arancio acridina: sciogliere in 100 mL di acqua distillata 0,01g di fosfato di sodio bibasico e 0'01g di arancio acridina,

Procedimento <sup>[16]</sup>:

- coprire il vetrino con la soluzione colorante e lasciar agire per 15 minuti senza riscaldare,
- lavare con acqua di fonte,
- aggiungere la miscela acido-alcol per 2 minuti, per la decolorazione,
- lavare con acqua di fonte e assicurarsi di drenare l'acqua in eccesso,
- colorare con permanganato di potassio per non più di 2 minuti. Se lasciato agire più a lungo, il permanganato di potassio può legarsi all'auramina attenuando così la fluorescenza di eventuali bacilli alcol-acido-resistenti,
- lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini,
- asciugare all'aria, non tamponare.

L'osservazione microscopica va effettuata entro 24 ore poiché la fluorescenza decade nel tempo; se ciò non è possibile, conservare i vetrini al buio alla temperatura di 2-4 °C. L'osservazione dei vetrini viene effettuata con un microscopio a fluorescenza dotato di lampada a vapori di mercurio con obiettivi da 30-50x. Con questa colorazione il preparato viene osservato con un filtro a luce blu, poiché l'auramina O è eccitata dalla luce blu ed emette nella regione da ~ 500 nm a ~ 650 nm. I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono fluorescenti in giallo-arancio contro lo sfondo scuro. Varianti della colorazione fluorocromica usano, come colorante primario, una miscela di auramina O e rodamina, che dà ai micobatteri un aspetto dorato, o, come colorante secondario, l'arancio di acridina, che produce uno sfondo rosso tendente all'arancio.



*Figura 6 – Nell' immagine si osserva la colorazione fluorocromica con Auramina: i micobatteri sembrano piccoli frammenti d'oro su uno sfondo totalmente nero*

Questo tipo di colorazione risulta molto vantaggioso soprattutto per quei laboratori di microbiologia che hanno *grosse routine di lavoro*, in quanto la visione del preparato con un campo microscopico così ampio permette un' esplorazione del vetrino più completa e rapida con una miglior accuratezza analitica. In caso di riscontro positivo si può passare alla colorazione di Ziehl- Neelsen sullo stesso preparato per confermare la presenza dei micobatteri <sup>[13]</sup>. Alcuni importanti vantaggi della microscopia a fluorescenza <sup>[15]</sup>:

- le immagini in fluorescenza ad alto contrasto consentono un rilevamento più semplice dei BAAR,
- l'uso di lenti di potenza medio-bassa (tipicamente 10x, 20x e 40x) consente un campo visivo più ampio rispetto alla microscopia convenzionale, dove si utilizza un ingrandimento 100X,
- il metodo di colorazione con fluorocromo è più semplice

### ***Osservazione microscopica***

Perché sia possibile rilevare microscopicamente la presenza di bacilli acido-alcol resistenti (BAAR), il materiale biologico in esame deve contenerne almeno  $5-10 \times 10^3$  micobatteri per ml (sensibilità del metodo). La sensibilità dell'osservazione diretta del singolo campione, che varia dal 22% al 78%, dipende dal tipo di campione, dalla specie micobatterica, dal metodo di rilevamento utilizzato e dall'esperienza di chi legge il



preparato microscopico. La sensibilità dell'esame si riduce quando sono presenti meno bacilli, come avviene nei primi mesi di riattivazione o in pazienti con co-infezione da HIV. Si suggerisce l'osservazione un numero adeguato di campi microscopici prima di refertare come negativo un dato campione; in particolare si considera l'analisi di circa 80 campi per la microscopia a fluorescenza e 300 campi per la microscopia ottica a immersione con ingrandimento 1000X. Il metodo di lettura utilizzato deve garantire l'osservazione di una porzione significativa del campione attraverso una serie di passaggi lungo l'asse maggiore e minore del preparato. I micobatteri tubercolari appaiono come bastoncelli lunghi e sottili (2-8x0,5 µm), a volte ricurvi, isolati o più spesso riuniti in gruppetti; possono presentare un aspetto bandeggiato con zone scarsamente colorate o del tutto prive di colore <sup>[15]</sup>. L'esame microscopico diretto va fortemente interpretato e valutato nel suo valore diagnostico. La carica microbica osservata viene espressa in maniera semi-quantitativa mediante l'adozione di uno SCORE (1+, 2+, 3+, 4+), in quanto tale informazione risulta utile per il monitoraggio della terapia. Quando nel preparato si osservano solo 1-2 bacilli acido-resistenti è buona norma chiedere altri campioni dello stesso paziente. Nella refertazione si deve specificare che la positività indica solo che sono stati osservati bacilli acido-alcol resistenti (BAAR), non necessariamente appartenenti al *M. tuberculosis* complex; l'eventuale negatività dell'esame non esclude la presenza di patologia tubercolare nel paziente, perché potrebbe trattarsi di un campione paucibacillare con una concentrazione di micobatteri per ml molto bassa <sup>[13]</sup>. L'esame microscopico è un elemento importante ai fini della valutazione della contagiosità del paziente, essendo questa direttamente correlata al N° di micobatteri presenti nelle secrezioni polmonari. La risposta va quindi comunicata al medico richiedente il più precocemente possibile, non oltre le 24 ore dalla ricezione del campione. Nonostante il riscontro di bacilli acido-resistenti all'esame microscopico dell'escreato costituisca una forte prova presuntiva di tubercolosi, per porre la diagnosi definitiva è necessaria una coltura dei micobatteri o un test di amplificazione degli acidi nucleici positivo.

### ***Controlli di Qualità*** <sup>[15]</sup>

Il controllo di qualità in microscopia è un processo necessario per monitorare, internamente, le prestazioni del lavoro di laboratorio. Consiste in un processo efficace e sistematico, che garantisce l'accuratezza, l'affidabilità e la riproducibilità del lavoro. Si

utilizzano un vetrino di controllo positivo e uno negativo, di norma inclusi in ciascuna serie di colorazioni, verificando la corretta esecuzione della procedura, nonché l'intensità della colorazione degli organismi acido-resistenti. I vetrini di controllo devono essere valutati prima della lettura degli strisci del paziente per confermare la correttezza della colorazione. Se i vetrini del controllo di qualità sono accettabili, è possibile leggere e refertare gli strisci del paziente. Se i vetrini di controllo sono inaccettabili, è necessario rivedere le procedure e le preparazioni dei reagenti. Dopo aver identificato e corretto il problema, tutti i vetrini del paziente devono essere ripetuti con una nuova serie di controlli. I microrganismi più comunemente usati come controllo negativo e controllo positivo sono rispettivamente *Escherichia coli* e *Mycobacterium gordonae*. I controlli possono essere preparati a partire da una sospensione dei microrganismi, trasferendone una goccia sulla superficie di un vetrino, lasciato asciugare all'aria e processato poi come gli altri preparati.

### ***Esame colturale***

L'esame colturale rappresenta il test di riferimento della diagnosi microbiologica di tubercolosi e deve essere sempre eseguito, anche quando non espressamente richiesto <sup>[15]</sup>. Il vantaggio principale rispetto alla microscopia dell'espettorato è la maggiore sensibilità, che consente il rilevamento di un numero molto basso di bacilli (da 10 a 100 bacilli / ml di espettorato rispetto ad almeno 5000 bacilli / ml di espettorato per microscopia). Data l'elevata sensibilità tale test viene eseguito su ciascun campione, sia in fase diagnostica, sia nei momenti critici del follow-up in cui il risultato dell'esame condiziona fondamentali passaggi dell'iter terapeutico. L'esame colturale è necessario per l'isolamento dei micobatteri, punto di partenza per l'identificazione delle specie e per l'esecuzione dei test di sensibilità ai farmaci. La prima sezione degli Standard dell'Unione Europea per la cura della tubercolosi (ESTC, aprile 2012), dedicata agli Standard per la diagnosi (da ESTC 1 a ESTC 6), specifica i requisiti minimi per ottenere una diagnosi di TB valida in diversi contesti o con vari tipi di sospetti, in ambito microbiologico e clinico. Se ciò non è fattibile, i test colturali dovrebbero essere eseguiti almeno per:

- diagnosi di casi con segni clinici e radiologici di TB polmonare in cui gli strisci sono ripetutamente negativi,

- diagnosi di TB extra-polmonare,
- diagnosi di tubercolosi infantile,
- diagnosi di tubercolosi tra adulti e bambini sieropositivi,
- diagnosi e monitoraggio di MDR e XDR-TB

L'isolamento dell'agente eziologico per una diagnosi microbiologica efficace dipende da:

- selezione del tipo corretto di campione
- qualità del campione
- uso adeguato delle procedure di immagazzinamento e trasporto
- 

### ***Raccolta e preparazione campioni***

I campioni biologici da inoculare in coltura si suddividono in <sup>[16]</sup>:

- contaminati dalla flora residente, tra cui campioni polmonari, quali: espettorato, espettorato indotto, tampone laringeo, lavaggio bronco-alveolare, aspirato bronchiale; ed extra-polmonari come: aspirato gastrico, urine, feci, prelievi autoptici, sangue mestruale.

Questi richiedono un processo di decontaminazione, omogeneizzazione e concentrazione

- non contaminati perché provenienti da siti sterili, quali ad esempio: liquidi cavitari, liquido cefalo-rachidiano, pus da ascesso freddo, biopsie chirurgiche. Questa tipologia di campioni richiede un trattamento di concentrazione, a meno che il clinico non segnali il sospetto di una concomitante infezione da altri batteri. È importante evitare l'utilizzo di fissativi o conservanti. In caso di trasporto prolungato, impedire la disidratazione con aggiunta di sol salina sterile mantenendo una T° tra 4-15°C

Per il trasporto al laboratorio, campioni e le colture devono essere riposti in una confezione a tre componenti <sup>[15]</sup>:

- un contenitore primario in plastica a bocca larga, sterile e monouso, con tappo a vite, senza aggiunta di sostanze fissanti o conservanti
- un imballaggio secondario
- un imballaggio esterno di resistenza adeguata alla sua capacità, massa e destinazione d'uso

### ***Fluidificazione e Decontaminazione*** <sup>[13]</sup>

L'esame colturale presenta delle peculiarità dati i lunghi tempi di duplicazione che caratterizzano i micobatteri e la concomitante presenza nei materiali patologici di altri

microrganismi contaminanti. Queste condizioni rendono necessario un trattamento di decontaminazione del campione, finalizzato alla riduzione ai più bassi livelli possibili della flora microbica non micobatterica, così che non influisca sulla crescita dei micobatteri. La decontaminazione del campione è un passaggio importante, poiché la flora normale, eventualmente presente in campioni contaminati, crescerebbe rapidamente sulla superficie del terreno inoculato, esauendo i fondamentali fattori di crescita prima che i micobatteri inizino a proliferare. Il trattamento implica l'uso di soluzioni acide e alcaline forti; può essere eseguito sul campione biologico senza ledere l'integrità dei micobatteri in quanto l'alto contenuto lipidico della loro parete batterica li rende molto resistenti all'azione degli agenti decontaminanti, fondamentale però è il rispetto dei tempi di contatto campione-decontaminante. I campioni devono essere, inoltre, omogeneizzati per liberare i bacilli dal muco, dalle cellule o dal tessuto in cui possono essere incorporati. Se si considera che il 70-80% dei campioni che giungono in laboratorio è rappresentato da espettorati, si comprende come, oltre al trattamento di decontaminazione del campione, debba essere eseguito anche un trattamento di fluidificazione che renda lo stesso campione libero da tralci muco-proteici che potrebbero intrappolare e nascondere eventuali micobatteri e dare false negatività.

In genere decontaminazione e fluidificazione avvengono contemporaneamente perché molti agenti decontaminanti agiscono anche come fluidificanti. È comunque possibile separare i due processi secondo procedure chimiche diverse e ben standardizzate.

La metodica con N-acetil-cisteina e NaOH 2% secondo Kubica (NALC-NaOH) è molto utilizzata nei laboratori di micobatteriologia e può essere considerata un metodo di riferimento per la coltura dei micobatteri. Infatti, se eseguita perfettamente, *l'incidenza delle contaminazioni* delle colture è contenuta mediamente *sotto* il 5%. Secondo le linee guida <sup>[14]</sup>, si ritiene accettabile un tasso di contaminazione pari al 3-5% su terreni solidi; mentre per i terreni liquidi sono tollerati tassi più elevati (5-10%). Un tasso di contaminazione che si avvicina a 0 è indice che la procedura di decontaminazione è stata troppo dura. Il sistema NALC.NaOH si basa sull'utilizzo combinato di N-acetil-cisteina, che agisce da fluidificante e NaOH 2% che agisce da decontaminante. Data la bassa concentrazione finale dell'idrossido di sodio, il metodo NALC-NaOH produce più colture positive rispetto ad altri metodi, poiché uccide solo il 30% circa dei bacilli tubercolari nei campioni clinici. La tecnica prevede un contatto per circa 15 minuti

di uguali volumi del campione in esame (non più di 10 ml) e della soluzione decontaminante preparata in precedenza e costituita da NaOH 2% miscelata in parti uguali con citrato di sodio anidro 2,6%, addizionato con N-acetil-L-cisteina in ragione dello 0,5%. Terminata la miscelazione del campione con la soluzione decontaminante è necessario vortexare più di una volta per favorire la fluidificazione. Dopo il tempo di contatto la soluzione fortemente alcalina viene tamponata aggiungendo pari volume di tampone fosfato 0,067 M a pH 6,8, quindi si centrifuga per 15-20 minuti a 3000 giri. La centrifugazione permette di aumentare considerevolmente la percentuale di positività dell'esame colturale. È consigliato l'uso di centrifuga refrigerata per evitare che, a causa dell'elevato numero di giri e del conseguente innalzamento della temperatura, la vitalità dei micobatteri venga compromessa. Nella fase successiva si risospende il sedimento con 1-2 ml di albumina bovina 0,2% per ottenere una sospensione, molto concentrata di potenziali micobatteri, utilizzata per la semina dei terreni solidi e liquidi ed eventualmente per l'amplificazione. Facoltativamente, il sedimento può essere congelato (- 20 ° C) in una fiala sterile con tappo a vite da 1,5-2 ml adeguatamente etichettata.

### ***Trattamento dell'espettorato***

Digerire e decontaminare sempre l'intero campione, senza tentare di selezionare porzioni del campione come si fa per la microscopia diretta. L'espettorato non deve essere elaborato in lotti di più di 6-8 poiché il metodo è strettamente dipendente dal tempo. Se l'espettorato non è già stato raccolto nelle provette da centrifuga, selezionare provette da centrifuga in plastica sterili con tappo a vite (una per ciascun campione). Decantare delicatamente dal contenitore del campione nella provetta da centrifuga. Decontaminare e fluidificare secondo il metodo classico NALC-NaOH

### **Digestione e decontaminazione di campioni diversi dall'espettorato** <sup>[15]</sup>

#### ***Tamponi laringei***

I tamponi devono essere coltivati il giorno in cui vengono ricevuti. Al fine di mantenere la sterilità, utilizzare una pinza sterile per trasferire il tampone in una provetta da centrifuga sterile in cui si aggiungono 2 ml di acqua distillata sterile. Agitare al vortex per almeno 30 secondi e recuperare/scartare il tampone. Concentrare mediante

centrifugazione. La sospensione ottenuta può essere sia seminata direttamente che previa decontaminazione; in quest'ultimo caso decontaminare secondo il metodo NaOH-NALC.

### *Lavaggi gastrici*

I campioni di lavanda gastrica devono essere processati il prima possibile dopo la raccolta, massimo entro 4 ore, poichè l'acidità del materiale biologico può uccidere i micobatteri nel campione. L'aspirato gastrico deve essere raccolto in una provetta contenente 100 mg di bicarbonato di sodio per neutralizzare l'acidità, e trasportato immediatamente al laboratorio. Procedere con la decontaminazione.

### *Materiali fluidi*

Se il campione è stato raccolto in modo asettico, centrifugare e inoculare il sedimento direttamente su terreno di coltura, preferibilmente mezzo liquido. I materiali che non dovrebbero essere decontaminati sono:

- fluidi corporei spinali, sinoviali o altri fluidi cavitari
- midollo osseo
- pus da ascessi freddi
- campioni asportati chirurgicamente (escluso materiale autoptico)
- materiale ottenuto da pleura, fegato e linfonodi, nonché biopsie

Per massimizzare la velocità di recupero, l'intero volume deve essere coltivato, preferibilmente in mezzo liquido.

### *Tessuto*

I linfonodi, le biopsie e altri tessuti asportati chirurgicamente devono essere tagliati in piccoli pezzi con un bisturi sterile per poi essere omogeneizzati in un mortaio di porcellana sterile o in un tritatore di tessuti utilizzando 5 ml di soluzione salina sterile e una piccola quantità di sabbia sterilizzata. Inoculare la sospensione su un terreno di coltura. Mortai, pestelli e trituratori di tessuti devono essere puliti e sterilizzati accuratamente per prevenire risultati falsi positivi o contaminazioni dovute a organismi rimasti dai campioni precedenti.

### *Urine*

Il campione va centrifugato a 3000 giri per 15 minuti. Dopo decantazione e ri-

sospensione del sedimento in 5 ml di soluzione salina si procede alla decontaminazione con metodo NALC-NaOH.

### *Feci*

Per l'esame colturale occorre sospendere una piccola quantità di materiale in 5 mL di brodo Middlebrook 7H9, omogeneizzare al vortex, filtrare su garza sterile per rimuovere i frammenti più grossolani, e decontaminare.

### ***Terreni di Coltura***

Per l'esame colturale dei micobatteri è necessario considerare la loro crescita più lenta rispetto ad altri batteri, e le loro particolari esigenze di crescita che ne impediscono l'isolamento primario su terreni semplici e chimicamente definiti. Gli unici terreni che consentono una crescita abbondante sono i terreni solidi arricchiti con uova contenenti glicerolo e asparagina e terreni agarizzati o terreni liquidi integrati con siero o albumina bovina. Considerati i vantaggi e gli svantaggi dei due tipi di terreni, le linee guida internazionali raccomandano l'utilizzo in parallelo di mezzi solidi, dove è possibile osservare colture miste e contaminanti, e mezzi liquidi che invece promuovono una crescita più rapida dei micobatteri. La scelta del terreno di isolamento dipende da molti fattori, tra cui, il più importante, il tipo di campione: per campioni provenienti da siti normalmente sterili si scelgono terreni non selettivi, mentre per campioni pesantemente contaminati può essere utile utilizzare un terreno selettivo, dato che non è raro che la decontaminazione non riesca a eliminare tutta la flora contaminante presente. Poiché nessun terreno di coltura è ideale, la scelta fra terreni all'uovo e terreni agarizzati è affidata all'esperienza del microbiologo. I terreni disponibili per la crescita di micobatteri, possono essere distinti in:

- Terreni selettivi, ovvero terreni che contengono agenti antimicrobici specifici per ostacolare la crescita di flora aspecifica contaminante, rappresentata da batteri e funghi eventualmente presenti nel campione biologico. Sono terreni raccomandati per campioni contaminati o potenzialmente contaminati. I più comunemente usati sono:
  - terreni selettivi a base di uova, ad esempio la modifica modifica Gruft del terreno Lowenstein-Jensen (contenente verde malachite, penicillina e acido nalidixico come

agenti selettivi), o il terreno Mycobactosel LJ (contenente verde malachite, cicloesimide, lincomicina e acido nalidixico come agenti selettivi)

- terreni a base di agar, come il terreno selettivo 7H11 (terreno di Mitchison), contenente carbenicillina, amfotericina B, polimixina B e trimetoprim come agenti selettivi

- terreni liquidi, generalmente costituiti da brodo Middlebrook 7H9 modificato aggiungendo una miscela di agenti antimicrobici

- Terreni non selettivi, consigliati per campioni provenienti da siti normalmente sterili. I terreni solidi più comunemente usati sono:

- Terreni a base di uova: il terreno Lowenstein-Jensen (LJ) è il terreno a base di uova più comunemente usato, specialmente per la coltura dell'espettorato. Contiene verde malachite come inibitore di organismi non micobatterici, glicerolo, fonte di carbonio, per favorire la crescita di *M. tuberculosis* ed L-asparagina come arricchimento. Il mezzo Ogawa presenta la medesima composizione di LJ, ma senza asparagina. Uno svantaggio dei terreni a base di uova è che, quando la contaminazione si verifica, può coinvolgere l'intera superficie, con perdita della coltura. Se i campioni contengono pochi bacilli, possono essere necessarie dalle tre alle otto settimane prima che le colture diventino positive.

- terreni agarizzati "semisintetici": costituiti da uno strato sottile e trasparente, consentono una più evidente visione delle colonie nelle prime fasi di crescita, con la tipica formazione a cordone, condizione che consente il conteggio delle colonie al microscopio, già dopo una settimana di incubazione. Tali terreni presentano il vantaggio di una precocità diagnostica anche se con la tassativa necessità di incubazione in atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub> 5-10%. Questi terreni vengono generalmente preparati in piastre o provette inclinate (a becco di clarino). I terreni Middlebrook 7H10 e 7H11 vengono solitamente preparati in laboratorio da basi in polvere di agar disponibili in commercio, con l'aggiunta di composti organici e albumina, cofattori vari compresa la biotina, che permette la crescita di micobatteri danneggiati, e una miscela di arricchimento OADC, contenente:
  - acido oleico, che riveste un ruolo importante nel metabolismo dei micobatteri
  - albumina, che agisce come agente protettivo legando gli acidi grassi liberi, tossici per i micobatteri, favorendo così il loro recupero



- destrosio, fonte di energia
- catalasi, che distrugge i perossidi tossici che potrebbero essere presenti nel terreno di coltura

In genere il terreno Middlebrook 7H11 è preferibile al 7H10, perché contiene lo 0,1% di idrolizzato di caseina, una sostanza che favorisce il recupero dei micobatteri resistenti agli isoniazidi. Inoltre, 7H11 è considerato migliore per la possibilità di coltivare ceppi multi-farmaco resistenti (MDR), che potrebbero non crescere affatto su piastre di agar 7H10. Uno svantaggio dei terreni Middlebrook è che la superficie si asciuga più rapidamente rispetto ai terreni a base di uova. I terreni di coltura liquidi, non selettivi, rappresentano un medium di crescita molto favorevole per lo sviluppo di *M. tuberculosis* e sono in genere utilizzati nei laboratori con intense routine giornaliere di micobatteriologia. I terreni liquidi offrono un considerevole vantaggio di tempo rispetto ai terreni solidi: i bacilli impiegano circa 7–14 giorni per crescere nel mezzo liquido Middlebrook 7H9, rispetto ai 18–28 giorni nell'agar Middlebrook 7H11, o 21–42 giorni nel terreno LJ

### ***Controllo di Qualità***

Il controllo di qualità del terreno è necessario per garantire che il ceppo isolato da un campione provenga dal paziente e che non sia, quindi, un contaminante presente negli ingredienti del terreno. La descrizione che segue si applica principalmente ai terreni solidi, poiché è su questi che le colonie sono visibili a occhio nudo ed è quindi possibile l'identificazione delle specie. I terreni preparati commercialmente non devono essere sottoposti a controllo di qualità per sterilità, crescita e selettività, a condizione che si ottenga la documentazione delle procedure di controllo della qualità del produttore. Le informazioni dovrebbero includere: la data di preparazione, il numero di lotto, la data di scadenza, gli organismi di prova utilizzati, la data di prova e il risultato. In tutti gli altri casi, quindi per terreni preparati dall'utente e quando non viene fornita la documentazione di sterilità, crescita e selettività, i terreni devono essere controllati per:

- condizioni medie: colore, disidratazione, contaminazione, bolle, ecc.
- sterilità: incubando dall'1 al 3% di ciascun lotto a 35-37 ° C in 5-10% di CO<sub>2</sub> fino a 21 giorni, testando la crescita di ceppi di controllo positivi e negativi

Gli organismi utilizzati come controlli positivi sono, generalmente, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare* e *M. fortuitum*. L'*Escherichia coli* viene utilizzato come controllo per dimostrare l'inibizione parziale da parte di terreni non selettivi e l'inibizione completa da parte di terreni selettivi. Procedura per l'allestimento di colture di controlli:

- Preparare una sospensione 0.5 McFarland degli organismi in brodo 7H9
- Inoculare il supporto con 10 µl della sospensione di controllo utilizzando una pipetta. Per testare le proprietà selettive dei terreni, inocularli con 10 µl di sospensione 1:10 in NaCl 0,85% sterile
- Incubare a 35–37 ° C in 5–10% di CO<sub>2</sub> fino a 21 giorni

### ***Procedura per inoculo su supporto solido***

In ogni provetta, sulla superficie inclinata del terreno, seminare una quantità pari a 0,2–0,4 ml del sedimento opportunamente decontaminato e/o concentrato, dopo aver rimosso l'acqua di condensa, eventualmente presente, sul fondo della provetta. Si raccomanda vivamente l'uso di pipette Pasteur sterili monouso per l'applicazione di 2-4 gocce di sedimento. L'inoculo deve essere distribuito su tutta la superficie del becco di clarino. Essendo la parte superiore dell'inclinazione del terreno piuttosto sottile tende a disidratarsi facilmente; se i micobatteri vengono seminati solo su questa sezione, potrebbero non crescere, portando nuovamente a risultati falsi negativi. L'utilizzo di un terreno a base di uova disponibile in commercio, integrato con una miscela di antibiotici, può aiutare a ridurre i tassi di contaminazione. Una quantità insufficiente di inoculo è una causa comune di risultati falsi negativi.

### ***Incubazione***

I terreni solidi a becco di clarino vengono incubati in posizione orizzontale e con il tappo allentato per qualche giorno/una settimana, per permettere l'evaporazione della parte liquida dell'inoculo. Trascorso tale tempo, il tappo viene serrato per evitare l'essiccazione del terreno, ed i flaconi incubati in posizione verticale per 8 settimane, sia per terreni all'uovo che agarizzati <sup>[16]</sup>. Ispezionare i terreni settimanalmente, per verificare se vi sia stata, o meno, crescita di micobatteri o di eventuali contaminanti <sup>[17]</sup>. In caso si osservi la crescita di colonie sulla superficie dei terreni, è necessario verificare l'alcol-acido

resistenza allestendo un preparato microscopico per discriminare la crescita di micobatteri da eventuali contaminanti. L'incubazione dei terreni in atmosfera contenente CO<sub>2</sub>, in concentrazione compresa tra il 5% e il 10%, è indispensabile per una stimolazione massima della crescita, che si verifica durante le prime due settimane di incubazione. La temperatura di incubazione deve essere compresa tra 35°C e 37°C [16]. Per i terreni su piastra incubare all'interno di sacchetti di polietilene permeabili alla CO<sub>2</sub> che ne evitano l'essiccamento [17].

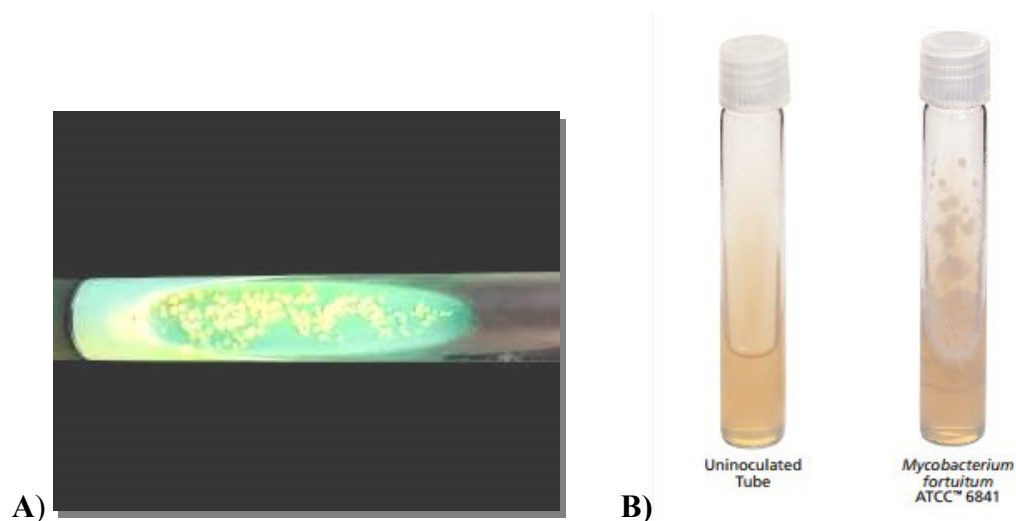


Figura 7 – L'immagine A) mostra la crescita di colonie su terreno di *M. tuberculosis* su Lowenstein-Jensen; l'immagine B) rappresenta un confronto tra un terreno Middlebrook 7H11 senza inoculo (a destra) e lo stesso terreno su cui sono cresciute colonie del ceppo *M. fortuitum* di controllo

### ***Procedura per inoculi in mezzi liquidi***

Esistono in commercio vari tipi di terreni liquidi per micobatteri alcuni dei quali prevedono l'impiego di apparecchi automatici per l'incubazione e la lettura [16]. L'inoculo su terreni liquidi deve essere eseguito in rigorose condizioni sterili per evitare il rischio di contaminazione, essendone quest'ultimi maggiormente suscettibili, rispetto ai terreni solidi. Per questo motivo è prevista l'aggiunta di una miscela di antibiotici specifici per ridurre/eliminare i contaminanti e di un arricchimento. Ogni provetta di coltura liquida deve essere adeguatamente etichettata ed inocolata con 0,5 ml di sedimento decontaminato, depositato sotto la superficie del terreno, mantenendo la provetta inclinata con un angolo di 45° [15].

### ***Incubazione***

Le provette vengono caricate nell'apposito strumento, dove saranno incubate a una temperatura di 37 °C per 6-8 settimane o fino alla rilevazione di positività. Sulle provette che lo strumento segnala come positive deve essere eseguito un esame microscopico, atto a verificare la presenza o l'assenza di bacilli alcol-acido-resistenti, e contestualmente, una semina su agar cioccolato per la ricerca di contaminanti. Quando lo strumento segnala la scadenza del periodo di incubazione è buona regola, prima di eliminare le provette considerate negative, esaminarle visivamente per individuare, se presente, torbidità o granuli che potrebbero indicare una crescita, non rilevata dallo strumento. In quest'ultimo caso occorre eseguire un preparato microscopico per verificare la presenza di bacilli alcol-acido-resistenti <sup>[16]</sup>.

Le strumentazioni automatiche garantiscono il monitoraggio continuo della crescita batterica con l'utilizzo di metodologie di tipo fluorimetrico, colorimetrico o radiometrico. Tra i metodi più utilizzati <sup>[17]</sup>:

- 1) manuali: Septi-Chek AFB, MGIT e MB-Redox
- 2) semiautomatici: Bactec 460 TB
- 3) automatici: Bactec 9000/F MB, Bactec MGIT 960, ESP Culture System II e MB/BacT

### **SEPTI-CHECK**

Septi-Chek è un sistema di coltura bifasico, che utilizza un flacone contenente brodo modificato Middlebrook 7H9 in cui si inocula 0,5-1 ml di campione decontaminato e concentrato. Questo comunica con un cilindro, collegato un supporto contenente 3 terreni solidi:

- Terreno a base di uova non selettivo
- Middlebrook contenente nitro-acetil-amino-idrossi-propioferone per la differenziazione di *M. tuberculosis* da altri micobatteri
- Agar cioccolato per verificare un eventuale contaminazione del campione

Periodicamente il sistema viene capovolto così che il brodo inoculato con il campione vada a bagnare le superfici dei terreni solidi; eventuali micobatteri presenti si moltiplicano nel brodo e vengono poi trasferiti sui terreni solidi dove daranno origine a colonie ben visibili, incubando a 37°C per 8 settimane. Questo sistema non richiede

strumentazione specializzata o l'uso di radioisotopi; combina la maggiore sensibilità e rapidità di crescita della coltura su terreno liquido fornendo nel contempo sub-culture simultanee su terreni soliti, già inclusi nel sistema.

### **SITEMA MGIT**

Il sistema MGIT permette di analizzare campioni clinici, sia di origine polmonare che extra-polmonare, per ottenere un isolamento primario nell'apposita provetta MGIT, utilizzando metodi tradizionali. Il sistema, in cui la rivelazione della crescita si basa sull'emissione di fluorescenza, non può essere utilizzato per sangue o campioni ematici, perché la fluorescenza verrebbe neutralizzata. Il campione decontaminato viene inoculato, per una quantità pari a 0,5ml, in una provetta MGIT, contenente terreno Middlebrook 7H9, addizionato di una miscela antibiotica (0,1 ml di PANTA), 0,25% glicerolo e 0,5 ml di una miscela di arricchimento (OADC) e sostanze essenziali per la crescita dei microrganismi. Si incubano le provette a 37°C in posizione verticale eseguendo una lettura giornaliera a partire dal secondo giorno di incubazione. Sul fondo della provetta è presente, incapsulato in un film di silicone, un composto fluorescente (complesso metallico di rutenio), sensibile alle variazioni della tensione di O<sub>2</sub>, che funge da sistema rivelatore. All'inizio, l'elevata quantità di ossigeno contenuto nel terreno riduce le emissioni del composto; in un secondo tempo, il consumo dell'ossigeno dal metabolismo attivo dei microrganismi in crescita riduce la tensione di O<sub>2</sub> con conseguente manifestazione/osservazione della fluorescenza grazie ad un transilluminatore UV da 365 nm o una lampada UV ad onde lunghe (lampada di Wood). La lettura viene eseguita confrontando la provetta campione con un controllo positivo e uno negativo. Il Controllo Positivo dovrebbe presentare una sensibile fluorescenza (colore arancione molto vivace), mentre il Controllo Negativo dovrebbe presentare debole o nessuna fluorescenza. È bene che l'operatore indossi, per motivi di sicurezza, occhiali protettivi UV quando osserva la fluorescenza, evitando di leggere i risultati in una stanza illuminata dai raggi del sole o oscurata. In caso di positività sul fondo della provetta si noterà un colore arancio brillante, visibile come riflesso sul menisco del brodo. La crescita può anche essere rilevata dalla presenza di torbidità non omogenea o di piccoli coaguli nel brodo di coltura. Proseguire l'indagine sottoponendo una piccola aliquota (circa 0,1ml) ad esame microscopico previa colorazione per BAAR e allestendo

sub-colture per una successiva identificazione mediante sonde a DNA. Il risultato positivo di un vetrino per l'acido-resistenza indica la probabile presenza di microrganismi vivi nel campione. In caso di negatività eseguire un controllo per eventuali contaminazioni batteriche.

### **MB REDOX**

È un nuovo sistema di coltura che utilizza provette MB redox, già pronte all'uso, contenenti 4 ml di terreno liquido Kirchner arricchito con glucosio, siero di cavallo, complessi vitaminici, OADC, catalasi e una miscela di antimicrobici costituita da polimixina B, amfotericina B, carbenicillina e trimetoprim. Il sistema di rivelazione sfrutta un indicatore redox che consente una facile visione macroscopica della crescita. Tale indicatore è rappresentato da sali di tetrazolio che appaiono come particelle di colore rosso-violetto quando vengono ridotti, dalla crescita dei micobatteri, a formano insolubile che si fissa alle micro-colonie rendendole facilmente osservabili.

### **Bactec MGIT 960**

Si tratta di un sistema automatizzato, basato sulla misurazione del consumo di ossigeno, mediante un sensore a fluorescenza ultravioletta, grazie al quale la crescita può essere rilevata entro una settimana. Lo strumento BD BACTEC MGIT 960 consente l'incubazione e la lettura, in continuo, delle provette MGIT di coltura. Si utilizzano flaconi contenenti 7 ml di terreno liquido Middlebrook 7H9 modificato, contenente:

-Brodo Middlebrook 7H9 modificato

-Peptone di caseina

-Glicerolo

-110 µl di indicatore Tris 4, 7-difenil-1, 10-fenantrolina cloruro di rutenio pentaidrato contenuto in una base di gomma di silicone

Le provette contengono inoltre CO<sub>2</sub> al 10% e sono chiuse con tappo a vite di polipropilene. I flaconi, prima di essere inoculati con il campione, devono essere supplementari con la miscela PANTA-OADC che consente l'arricchimento (con l'OADC) e l'aggiunta del mix di antibiotici (PANTA) per rendere il brodo di crescita maggiormente selettivo verso i Micobatteri. Il sedimento del campione, ottenuto dopo decontaminazione con il metodo classico NALC-NAOH e concentrazione viene inoculato (0,5 ml). Si

ricorda di utilizzare 0,1 ml dello stesso campione per l'inoculo contemporaneo di terreni in agar. La provetta MGIT viene inserita nello strumento Bactec dove viene accettata ed incubata a 37 °C. Per la lettura dei flaconi lo strumento fa fede ad un sofisticato sistema ottico, che sfrutta la rilevazione del segnale di fluorescenza emesso dai flaconi positivi. Il detector legge, muovendo da sinistra a destra e dall'esterno verso l'interno, la fluorescenza che, il sensore situato al fondo del flacone, emette in caso di riduzione dell'ossigeno. Detto sensore, incorporato e protetto in una matrice solida, risulta sensibile e inibito dall'ossigeno presente nel mezzo; quando il metabolismo dei micobatteri riduce la tensione di ossigeno nel terreno, il sensore emette fluorescenza. Il Sistema effettua la lettura del Flacone ad intervalli di 1 ora, e costruisce la curva di interpretazione estrapolando ogni punto della curva attraverso il valore medio di 5 letture successive.

### **BD BACTEC 9000**

Il sistema BACTEC 9000 MB è un sistema fluorimetrico automatico che consente la coltura di micobatteri a partire da materiali biologici polmonari ed extra-polmonari, compreso il sangue. Utilizza il brodo Middlebrook 7H9 modificato con l'aggiunta di idrolisato di caseina, citrato ferrico di ammonio, glicerolo e Tween 80. Lo stesso flacone, addizionato di una miscela di antibiotici per ostacolare la crescita dei contaminanti, viene inoculato con il campione decontaminato e concentrato. Il Sistema BD BACTEC 9000 è costituito da un modulo strumentale completamente automatico, con le caratteristiche combinate di:

- Incubatore
- Agitatore
- Lettore

L'incubazione continua è consentita da una struttura a stazioni termostata (a 35 °C +/- 1,5); mentre la lettura in continuo, per la quale ogni flacone viene letto ogni 10 minuti, è legata ad un sofisticato meccanismo su base ottica che sfrutta la produzione di CO<sub>2</sub> del metabolismo batterico. Il Sistema presenta, inoltre, meccanismi di controllo del corretto svolgersi dell'esame con segnalazioni specifiche nel caso di errori dell'utente, situazioni ambientali sfavorevoli o alterazioni di altro genere. La rilevazione della crescita batterica in fase liquida avviene mediante metodo fluorimetrico: il sensore sul fondo del flacone contiene composti fluorescenti che reagiscono in presenza di CO<sub>2</sub>. Il sensore si trova

incorporato in una matrice solida protettiva, che consente la diffusione selettiva della CO<sub>2</sub> dal brodo di coltura. Con un diodo ad emissione luminosa, un rivelatore di fotodiodi e filtri adeguati, viene misurata la radiazione luminosa (fluorescenza) proveniente dal sensore fluorimetrico e non quella riflessa da altre superfici. Tale tecnologia, che utilizza un segnale ad emissione di fondo molto bassa, consente al computer gestionale di costruire curve di crescita molto precise. La segnalazione di flaconi positivi è immediata, attraverso segnali ottici e, facoltativamente, acustici. Dai flaconi positivi è possibile effettuare indagini microscopiche ed eseguire sub-culture senza difficoltà e controindicazioni relative ai componenti del brodo di crescita. Nel caso di esami batterioscopici e/o colturali negativi, il flacone può essere reinserito nello strumento per ulteriori verifiche.

### **BacT ALERT 3D**

Il sistema BacT ALERT 3D è completamente automatizzato e sfrutta un metodo fotocolorimetrico per la rilevazione di CO<sub>2</sub>. Utilizza flaconi di due tipi: uno dedicato esclusivamente alla coltura di campioni ematici e uno da utilizzare per i campioni diversi da sangue contenente 10 mL di brodo Middlebrook 7H9 arricchito con caseina, sieralbumina bovina e catalasi. Al terreno devono essere aggiunti 0,5 mL di miscela antibiotica e di fluido di ricostituzione per poter poi inoculare 0,5 ml di sedimento del campione, previa decontaminazione e concentrazione. Sul fondo di ogni flacone è presente un sensore permeabile ai gas che vira progressivamente dal verde al giallo in presenza di CO<sub>2</sub>, il cui aumento è legato alla produzione da parte di micobatteri in fase attiva di crescita. I flaconi sono incubati all'interno dello strumento in apposite celle che presentano alla base un'unità di lettura dotata di un riflettometro elettronico che registra le variazioni colorimetriche dei flaconi. I valori rilevati sono trasmessi ogni 10 minuti ad un computer che segnala i flaconi in cui è presente crescita. La positività viene segnalata dallo strumento con un segnale visivo ed acustico.

### **ESP Culture System II**

L'ESP Culture System II è un sistema completamente automatizzato di monitoraggio continuo per la crescita e il rilevamento di micobatteri, disponibile per uso commerciale da alcuni anni. La tecnologia dell'ESP II si basa sul rilevamento di variazioni di pressione



(cioè, la produzione di gas o il consumo di gas a causa della crescita microbica) all'interno dello spazio di testa sopra il mezzo di coltura del brodo in una bottiglia sigillata. Uno speciale algoritmo di rilevazione è stato sviluppato per i micobatteri a crescita molto lenta. Recentemente, è stato sviluppato per l'ESP un metodo per testare la suscettibilità degli isolati di MTBC all'isoniazide, alla rifampicina, all'etambutolo e alla streptomina.

### ***EMOCOLTURA***

Il sangue, per la ricerca dei micobatteri, non è considerato materiale di elezione a livello diagnostico, poiché i micobatteri sono presenti in bassa carica e in maniera intermittente. Per questo la richiesta di emocoltura deve essere basata su fondati sospetti clinici <sup>[16]</sup>; è giustificata in pazienti immunodepressi nei quali tali microrganismi possono dare luogo ad infezioni disseminate. L'esecuzione di emocoltura, utilizzando flaconi specifici per micobatteri, è indicata solo nei seguenti casi <sup>[14]</sup>:

- Soggetti immunocompetenti con sospetto di:
  - forma tubercolare disseminata
  - quadro radiologico di tubercolosi miliare
- Soggetti HIV positivi o immunocompromessi per altre cause con sospetto clinico di TB miliare o di micobatteriosi atipica disseminata che presentano:
  - Febbre prolungata da > 7 giorni e
  - Conta linfociti CD4+ < 100/mm<sup>3</sup>
  - Non profilassi in atto per *Mycobacterium avium complex* (MAC)

### ***Modalità di prelievo del campione e tempi di incubazione*** <sup>[16]</sup>

Il materiale biologico per l'emocoltura può essere:

- un classico prelievo ematico da vena periferica (da un minimo di 2 a un massimo di 3 campioni di sangue raccolti in giorni diversi)
- aspirato midollare per la mielocoltura
- sangue mestruale, in caso di sospetta malattia tubercolare a carico dell'apparato genitale femminile

Il prelievo può essere inoculato in specifici flaconi da emocoltura per micobatteri se si dispone dello strumento automatico specifico. In alternativa è possibile utilizzare, per il

prelievo di sangue, normali provette contenenti *eparina* o *sodio polianethol sulfonato* (SPS) ed inviato in laboratorio dove verrà inoculato negli specifici flaconi.

Non sono idonei i campioni prelevati in provette contenenti *acido etilen-diamino-tetra-acetico* (EDTA), poiché tale sostanza agisce come inibitore della crescita dei micobatteri. I campioni di sangue o i flaconi per emocoltura, che non possono essere processati subito, vanno tenuti a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. È consigliabile incubare i campioni fino ad 8 settimane, anche quando i protocolli dei sistemi in uso prevedono tempi più brevi. A causa della paucibacillarità dei campioni ematici non è utile l'esecuzione dell'esame microscopico, mentre è consigliabile prolungare il tempo di incubazione delle colture almeno per 8 settimane, anche nei sistemi i cui protocolli prevedano incubazioni più brevi. Per discriminare la crescita di micobatteri dalle contaminazioni, verificare l'alcol-acido resistenza dei microrganismi cresciuti nei terreni, eseguendo una colorazione specifica su preparato microscopico del sedimento. In assenza di disponibilità dello strumento automatico, dovrebbe essere utilizzato il sistema ISOLATOR per la lisi-centrifugazione. Il sistema utilizza una provetta contenente una miscela di reagenti in grado di lisare le cellule ematiche senza ledere la vitalità dei micobatteri. Il concentrato ottenuto per centrifugazione può essere seminato su tutti i tipi di terreno, sia solidi che liquidi; i terreni liquidi hanno comunque una maggiore sensibilità rispetto a quelli solidi e tempi di crescita più brevi.

*Procedimento:*

- raccogliere, nella provetta Isolator 10, 10 ml di sangue prelevato dalla vena del paziente (1,5 ml nella provetta Isolator 1.5, se si tratta di pazienti pediatrici) e miscelare per inversione
- centrifugare a 3000 xg per 30 minuti con apposita centrifuga con rotore ad angolo fisso
- applicare il dispositivo di perforazione (fornito) e, utilizzando l'apposita pressa, perforare il diaframma di gomma
- introdurre la pipetta più corta e prelevare il sovrantante che verrà quindi scartato
- agitare al vortex la provetta per 10 secondi
- utilizzando la pipetta più lunga, prelevare l'intero sedimento e seminarlo su idonei terreni di coltura
- incubare e leggere i terreni di coltura secondo le modalità consuete

### ***Controllo di Qualità interno***

La fertilità di ciascun lotto di terreno impiegato per emocolture deve essere controllata con un ceppo di *M. tuberculosis* ed uno di *M. intracellulare*.

### **IDENTIFICAZIONE**

Una volta isolato in coltura il microrganismo può essere identificato come *Mycobacterium tuberculosis* complex utilizzando:

- a) i tradizionali test biochimici <sup>[17]</sup> quali la produzione di niacina e la riduzione dei nitrati che presentano tuttavia il grave limite di non poter essere applicati alle colture in terreno liquido, richiedendo lo sviluppo in terreno solido
- b) NAP test <sup>[17]</sup>, una prova di inibizione selettiva applicabile su colture eseguite con metodo radiometrico. Il NAP (para-n-alfa-acetilazione beta-idrossi-propiofenone) è capace di inibire lo sviluppo delle specie appartenenti al *M. tuberculosis* complex, mentre è tollerato ai micobatteri non tubercolari. Per il test è richiesta una coltura pura del micobatterio in esame in brodo radiometrico con GI compreso fra 50 e 100 (se GI è maggiore di 100, diluire la coltura); e un flaconcino di coltura contenente un dischetto impregnato di NAP. Incubare a 37°C e leggere giornalmente, con l'apparecchio Bactec 460TB, sia la brodocoltura usata per l'inoculo (che servirà da controllo) sia quella contenente NAP, per un massimo di sette giorni. Può essere completato in 3-5 giorni.
- c) cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) <sup>[17]</sup> applicata all'analisi del pattern degli acidi micolici, componente lipidica che caratterizza la parete dei micobatteri, da cui si ricava un tracciato specie-specifico
- d) identificazione mediante MALDI-TOF <sup>[16]</sup>. Richiede l'applicazione di particolari procedure di inattivazione dei micobatteri e di estrazione delle proteine, entrambe, solo recentemente, standardizzate da due protocolli. I due protocolli messi a punto possono essere applicati sia a colture su terreno solido che liquido e prevedono una fase di inattivazione con etanolo (e, se necessario, con trattamento termico) e un'estrazione proteica con acido formico e aceto nitrili. Il campione, inattivato ed estratto, viene applicato su due spot di una piastra e cristallizzato con aggiunta della matrice organica. La piastra viene inserita nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa. Lo strumento genera uno spettro di massa poi confrontato con un "database" di spettri di

specie note. Gli strumenti oggi disponibili sul mercato consentono, in meno di 2 ore, un'ottima identificazione.

e) test immuno-cromatografico per l'identificazione rapida dei ceppi appartenenti al *M. tuberculosis complex*, che secernono, durante la coltura, la proteina MPT64 <sup>[14]</sup>. Esistono in commercio sistemi lateral flow in grado di rilevare in pochi minuti la presenza della suddetta proteina utilizzando 100 µL di brodocoltura positiva. Il test è di facile interpretazione: se positivo compare una banda specifica; una seconda banda deve comparire tassativamente, essa conferma infatti che il test è stato eseguito correttamente. È un test immuno-cromatografico basato sulla rilevazione mediante anticorpi monoclonali marcati con particelle colloidali <sup>[15]</sup>

e) specifici test molecolari (sonde a DNA con o senza amplificazione). I sistemi di identificazione commerciali basati sull'uso di sonde molecolari sono utilizzabili a partire da organismi cresciuti su terreno solido o liquido. Tali sistemi rappresentano attualmente lo strumento più affidabile a disposizione dei laboratori che non hanno accesso al sequenziamento <sup>[16]</sup>. Tra i test utilizzati per l'identificazione su coltura c'è il saggio INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 <sup>[15]</sup>, un test line probe per il rilevamento e l'identificazione simultanei del genere *Mycobacterium* e 16 diverse specie, tra cui *M. tuberculosis complex*. Il test è basato sulle differenze nucleotidiche nella regione spaziatrice dell'rRNA 16S-23S; può essere eseguito a partire da colture solide e liquide. L'esecuzione del saggio prevede una fase di estrazione del DNA, amplificazione del frammento di interesse mediante PCR e rilevazione tramite ibridazione con strisce reattive, dove con la formazione di una banda colorata è possibile identificare la specie. Secondo uno studio la specificità e sensibilità complessive del test erano entrambe del 100% per la sonda genere-specifica. Per le altre sonde la sensibilità è stata del 100%, mentre la specificità totale è stata del 92,2% (o del 94,4% escludendo due ceppi rari inclusi invece nell'indagine). Un altro saggio molecolare necessario per identificare *M. tuberculosis* sia su colture solide che liquide, è il test AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* Kit (Gen-Probe Inc.) <sup>[15]</sup>. Tale metodo impiega una sonda a Dna a singola catena, associata ad un marker chemiluminescente, e complementare all'rRNA ribosomiale del micobatterio bersaglio. La formazione dell'ibrido sonda DNA-rRNA questo viene rilevate con l'emissione di un segnale luminoso emesso dal marker. In

relazione all'intensità della luce emessa, si otterrà un risultato positivo, se il valore è maggiore del valore soglia, altrimenti si avrà un risultato negativo <sup>[17]</sup>.

## **4.2. Diagnosi molecolare**

I limiti dei metodi convenzionali per la diagnosi della tubercolosi (ridotta sensibilità per l'esame microscopico e lunghi tempi di crescita per l'esame colturale) hanno stimolato l'attività di ricerca ad elaborare nuovi metodi, più rapidi ed economici, tra cui test diagnostici molecolari, utili nel ridurre i tempi necessari alla rilevazione e identificazione di microrganismi nei campioni clinici <sup>[18]</sup>. La maggior parte dei test molecolari consente il rilevamento e l'identificazione della specie, su campioni clinici, sfruttando l'amplificazione di acidi nucleici specifici, sia DNA che RNA, per il *M. tuberculosis complex*. Alcuni test permettono il rilevamento di mutazioni geniche associate alla resistenza farmacologica nei confronti di farmaci anti-tubercolari, mediante sequenziamento e ibridazione <sup>[19]</sup>. In qualsiasi tecnica di diagnostica molecolare, una sequenza di acido nucleico d'interesse, presente nel campione clinico, viene ibridata con una sequenza complementare (sonda), l'ibrido che si forma viene poi rilevato. La sensibilità di rilevazione, pari a 10 AFB/ml, richiede un'amplificazione tramite primer opportunamente disegnati, così da ottenere una quantità sufficiente di ampliconi per l'ibridazione con sonda e successiva rilevazione <sup>[18]</sup>. Con il sequenziamento del genoma di *M. tuberculosis*, è stata individuata una vasta gamma di scelta per il target di amplificazione <sup>[20]</sup>. Questo insieme di geni d'interesse comprende target specie-specifici e gruppo-specifici, ma anche geni associati all'acquisizione di resistenza ai farmaci. Tra le sequenze bersaglio ricordiamo i geni che codificano per l'antigene P32, l'antigene 5 (38kDa), o l'antigene 65 kDa, o i geni dnaJ, groE1, o mtb-4. I target utilizzati più di frequente sono le regioni ripetitive IS6110 e IS986 <sup>[18]</sup>. La regione IS6110 rappresenta un elemento di inserzione che si trova esclusivamente all'interno dei membri di *M. tuberculosis complex* (MTBC), e a causa di questa esclusività, è diventato un importante strumento diagnostico per l'identificazione delle specie. IS986, invece, appartiene alla famiglia IS3-like di sequenze di inserzione, ed è stato dimostrato di essere presente in più copie nel cromosoma di *M. tuberculosis*. Entrambe le sequenze sono presenti, in media, in un numero variabile tra 1 e 30 copie. Anche l'rRNA può essere considerato un bersaglio utile, perché presente in migliaia di copie all'interno di microrganismi batterici

[20]. Può essere utilizzato per saggi molecolari, sia come bersaglio diretto (es. TMA), sia come bersaglio per una trascrittasi inversa, grazie alla quale viene convertito in cDNA, poi utilizzato come bersaglio di amplificazione. Il campione più comunemente sfruttato per la rilevazione di *M. tuberculosis* è l'espettorato, per pazienti con tubercolosi polmonare, anche se il lavaggio bronco-alveolare (BAL) si è rivelato un buon campione, nel medesimo contesto. Altre tipologie di campioni sono state analizzate con metodi molecolari, a seconda della manifestazione clinica e del sito di infezione tubercolare. Il liquido cerebrospinale, è un campione comune per pazienti immunocompromessi in cui si presenta un sospetto di meningite tubercolare. Il liquor è un buon campione in tale contesto, soprattutto perché raramente contiene inibitori per la reazione di amplificazione. Sangue, urine e campioni tissutali si sono rilevati buoni materiali per l'amplificazione, anche se hanno manifestato un più alto numero di falsi negativi, correlato alla maggior probabilità di presenza di sostanza inibitrici. Come per ogni tecnica diagnostica, anche i test molecolari devono essere caratterizzati da un ottimale sensibilità e specificità. La Tabella 1 illustra in dettaglio i fattori che possono rappresentare un problema di riduzione di sensibilità e specificità, e come affrontarli per migliorare i risultati.

*Tabella 1 - Cause e soluzioni di risultati alterati* [20]

	CAUSA	SOLUZIONE
Ridotta specificità	Contaminazione del campione	Miglioramento della pratica di laboratorio. Se possibile, aggiunta di fasi di rimozione dei contaminanti
	Progettazione scadente del saggio. Rilevazione di altri agenti non infettivi	Maggiore attenzione della progettazione e sviluppo del saggio
Ridotta sensibilità	Inibitori presenti nel campione	Migliorare la procedura di estrazione. Includere un controllo di inibizione
	Assenza di patogeni infettanti nel campione	Aumentare il numero di campioni per coprire più tipi e punti temporali

Le tecniche di amplificazione molecolare, pur essendo incredibilmente potenti ed in grado di rilevare un numero molto basso di frammenti di DNA bersaglio, possono portare a risultati falsamente positivi in caso di livelli, anche minimi, di contaminazione. È possibile adottare diverse strategie per ridurre la contaminazione nel campione. Il più importante, a livello di indagini molecolari, è quello di avere ed assegnare ambienti fisici

separati e dedicati ai vari step dell'indagine, dal trattamento del campione alla rilevazione. Alla separazione degli ambienti di lavoro deve essere associato un flusso di lavoro unidirezionale, per evitare contaminazioni. Ulteriori approcci includono l'uso di UTP, come nucleotide nelle reazioni di amplificazione, piuttosto che TTP, così da differenziare il genoma di partenza (con timina) dai prodotti di amplificazione, che contengono invece uracile nella sequenza. Questa differenza permette l'utilizzo di un trattamento con reagenti contenenti uracile-n-glicosilasi (UNG) all'inizio di ogni sessione di PCR per eliminare eventuali residui di amplificato di reazioni precedenti. Un fattore che influenza la specificità della reazione è rappresentato dalla sequenza del primer o della sonda utilizzata nel saggio. Occorre, quindi, prestare attenzione nella selezione e nella progettazione dei primer di amplificazione, i quali devono presentare unicità della sequenza, ovvero non devono essere presenti nel DNA stampo altre regioni complementari. Deve inoltre essere verificata l'assenza di omologie interne o verso altri primer, per evitare la formazione di prodotti aspecifici (dimeri di primer). Queste situazioni aumentano il rischio di diagnosi errata. Un esempio pratico si ha in caso di utilizzo di alcuni set di primers selezionati per l'amplificazione della regione IS6110, con bersaglio sequenze condivise anche da micobatteri non tubercolari. La sensibilità può essere ridotta dalla presenza di inibitori con conseguenti risultati falsi negativi. I campioni clinici, anche se trattati, possono contenere sostanze inibitrici, motivo per cui è necessario prendere provvedimenti atti a risolvere il problema; tra questi, l'utilizzo di controlli interni permette di valutare l'efficienza del saggio e rilevare l'eventuale presenza di inibitori. Un valido aiuto si ottiene anche dal miglioramento dei protocolli di estrazione di acidi nucleici dal campione. Le tecniche molecolari presentano molteplici vantaggi:

- sono tecniche molto sensibili, permettono di individuare la presenza di 1-10 micobatteri in un campione <sup>[18]</sup>
- hanno elevata specificità <sup>[18]</sup>
- consentono di individuare i micobatteri, identificarne la specie e valutarne la farmacoresistenza, grazie alla scoperta di mutazioni geniche a livello di geni che codificano per proteine bersaglio di alcuni farmaci <sup>[19]</sup>
- forniscono velocemente i risultati con una riduzione del tempo necessario per la diagnosi da una media di 37,5 a 22 giorni <sup>[20]</sup>

Allo stesso tempo, però, presentano anche evidenti limiti:

- il confronto tra l'utilizzo di diversi test commerciali ha evidenziato marcate variazioni nell'accuratezza del test. Nel caso di campioni positivi all'esame microscopico, la sensibilità media varia da 96-98%, mentre la specificità media dal 71 al 96%. Per i campioni, invece, negativi all'esame microscopico la sensibilità media è compresa tra il 57% e 76%; mentre la specificità media variava dal 97 al 98% [21]
- hanno costi elevati [18]
- non sono in grado di distinguere tra bacilli tubercolari vitali o morti, motivo per cui si può riscontrare un disaccordo tra l'indagine microscopica dell'espettorato e l'indagine molecolare [18]
- richiedono un'attenta interpretazione a causa di fattori confondenti che possono influenzare i risultati, quali: gli obiettivi del test, la natura e la quantità del campione, i metodi ed il tempo di conservazione prima della processazione, la procedura, la presenza di sostanze inibitrici, cross-contaminazioni tra campioni e il metodo di rilevazione utilizzato [21].

Le tecniche di amplificazione basate su DNA e RNA rilevano micobatteri direttamente nei campioni clinici. È tuttavia necessario che la molecola target venga amplificata ad un livello rilevabile [18].

### ***TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE***

#### ***Strand Displacement Amplification (SDA)***

È una metodica di amplificazione isoterma, semi-quantitativa, in vitro. Questa tecnica si avvale dell'azione combinata dell'enzima di restrizione Hinc-II, che ha la capacità di tagliare il singolo filamento non modificato di emi-fosforo-tiorato dal sito di restrizione, e la capacità del frammento di Klenow della DNA polimerasi di E. coli di iniziare, da un nick su singolo filamento di DNA a doppio filamento, ad estendere un filamento dall'estremità 3', spiazzando il filamento a valle [22]. La metodica permette una rapida identificazione del M. tuberculosis complex e di altre specie micobatteriche. Nel primo caso il frammento target di DNA è la sequenza ID6110; mentre per le altre specie è la subunità 16D dell'rRNA. Nella fase iniziale il target viene amplificato grazie alla presenza di 2 coppie di primer complementari a sequenze nucleotidiche contigue all'interno del target. I primer si legano ad un filamento di DNA denaturato, dove vengono allungati ad opera di una DNA polimerasi:



l'allungamento del primer "a monte" (bumper) causa il distacco del primer a valle, che contiene il sito di restrizione, e che, nel contempo, si allunga fino alla sua completa liberazione. Il primer "a monte", quindi, spiazza il primer "a valle". Segue la fase di amplificazione esponenziale in cui un nuovo primer si lega all'amplicone e si estende formando un doppio filamento; contemporaneamente, per effetto dell'enzima di restrizione, l'amplicone originale viene scisso in due frammenti, di cui quello "a monte" agisce da bumper e, allungandosi, spiazza il frammento "a valle". Il frammento spiazzato funge da stampo per il primer a valle e contemporaneamente si allunga ricreando il sito di restrizione. In ogni seduta viene co-amplificato anche un controllo interno avente sequenza di annealing identica al target, necessario alla valutazione dell'efficienza del saggio [21]. L'amplificazione esponenziale con SDA consente la produzione di  $10^7$ - $10^8$  amplificati in circa 2 ore. Al termine si rileva l'amplificato in tempo reale grazie a sonde marcate con  $^{32}P$  che ibridizzano con i primer. La reazione chemiluminescente è misurata da un luminometro. Grazie alla specificità della reazione SDA, basata sulla scelta dei primer, combinata con la rilevazione in chemiluminescenza dell'amplificato con ibrido sonda-target, l'intero processo può essere completato in circa 4 ore dal ricevimento del campione clinico [21].

- **Polymerase chain reaction (PCR)**

La reazione a catena della polimerasi è una tecnica in vitro che permette l'amplificazione esponenziale di un frammento di DNA d'interesse, ottenendo, in tempi brevi, milioni di copie di amplificato. La tecnica si basa sulla ripetizione ciclica (circa 30-40 volte), di tre fasi distinte. La prima fase prevede una denaturazione termica ( $94^{\circ}C$ ) del DNA per separare i due filamenti; la seconda fase, ad una temperatura inferiore ( $55$ - $65^{\circ}C$ ) prevede l'annealing di una coppia di primer complementari alle regioni adiacenti alla sequenza di interesse; la terza fase di estensione, a temperatura di  $72^{\circ}C$ , favorisce l'allungamento dei primer, che fungono da innesco per la DNA polimerasi che estende il filamento grazie a desossi-ribonucleotidi (dNTPs) presenti, in eccesso, nella mix di reazione. Tra le sequenze bersaglio per l'amplificazione spiccano: la regione IS6110, IS986, il gene mtp-40 e l'antigene 65kDa [22]. L'efficacia della PCR dipende, strettamente, da diversi parametri di amplificazione, inclusa la concentrazione del DNA, la dimensione e la ripetitività della sequenza bersaglio. La specificità del processo risiede soprattutto

sulla complementarità e specificità dei primer scelti. In generale il processo di amplificazione può essere completato in 2-4 ore dall'arrivo del campione in laboratorio, e il test di rilevamento può essere completato in altre 2-24 ore. In campioni di espettorato positivi all'esame colturale la sensibilità e la specificità della PCR per *M. tuberculosis* sono superiori al 95%; in campioni negativi la specificità è analoga, ma la sensibilità è del 40-77%

- **Ligase chain reaction (LCR)**

È una variante della PCR, potenzialmente utile per lo screening di soggetti ad alto rischio di sviluppare la malattia tubercolare. Così come la PCR, è una reazione ciclica basata sulla variazione di temperatura, che sfrutta una ligasi termostabile per legare due primer complementari alla sequenza di DNA. Presenta un'elevata sensibilità e specificità per campioni respiratori, sia positivi che negativi all'esame microscopico. Attualmente questa tecnica è limitata dal costo elevato e dalla richiesta di personale qualificato [18]

- **Transcription mediated amplification (TMA)**

È una metodica di amplificazione isoterma, basata sull'amplificazione dell'RNA ribosomiale (rRNA), sviluppata da Gene-Probe Inc. Questo test mima la replicazione retro-virale che sfrutta una trascrittasi inversa per produrre un frammento di cDNA, a partire dall'rRNA di partenza, poi usato come stampo per la produzione di migliaia di copie di RNA, rilevabile grazie a sonde marcate con esteri di acridinio (chemiluminescenza). L'intero test può essere completato in 3-4 ore dall'ottenimento del campione. Nei campioni respiratori il test presenta una sensibilità del 75-100%, e una specificità del 95-100%. Il test consente una rapida identificazione di *M. tuberculosis* nei pazienti con positività allo striscio, e può migliorare notevolmente la sensibilità rispetto al solo striscio per la ricerca di bacilli alcol-acido resistenti [22].

Tra le applicazioni dei saggi molecolari nella diagnostica della tubercolosi, vi è la possibilità di individuare mutazioni nei geni associati alla resistenza ai farmaci antitubercolari. Il numero dei farmaci antitubercolari, al momento disponibili, è limitato dalla resistenza intrinseca dei micobatteri, appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis complex*, alla maggior parte degli antibiotici noti, a causa di peculiari caratteristiche morfologiche e strutturali: la struttura della parete cellulare, spessa e altamente

idrofobica, e la presenza di beta-lattamasi e di sistemi di espulsione attiva <sup>[16]</sup>. In più, la recente comparsa di MDR-TB e XDR-TB, ha richiesto mezzi rapidi e accurati per la determinazione delle resistenze ai farmaci di *M. tuberculosis complex* <sup>[21]</sup>.

L'esecuzione dell'antibiogramma colturale rimane imprescindibile per la rilevazione di resistenze ai farmaci <sup>[16]</sup>. I metodi di coltura sono basati sulla valutazione della capacità di *M. tuberculosis* di crescere in terreni di coltura contenenti agenti anti-TB (che indica resistenza) o, al contrario, la sua incapacità di crescere nello stesso terreno (che indica suscettibilità). Alcuni di questi metodi sfruttano la *concentrazione critica* di un farmaco (concentrazione più bassa di farmaco che inibisce la crescita di ceppi selvatici di *M. tuberculosis* che non sono mai stati esposti a farmaci per la tubercolosi); altri, invece, la *MIC* (minima concentrazione inibente). Per un DST (Drug Sensitivity Testing) fenotipico, i micobatteri vengono inizialmente coltivati in una varietà di terreni di coltura solidi, come il Löwenstein – Jensen, Middlebrook 7H10 Agar, Middlebrook 7H11 arricchito, o terreni liquidi, come il Middlebrook 7H9, utilizzato come mezzo di crescita micobatterica in un sistema automatizzato (BACTEC MGIT960 e MB/Bact), in grado di fornire risultati comparabili ai test basati su supporti solidi con il vantaggio di risultati più rapidi. I metodi convenzionali per i DST includono, tipicamente, i metodi di proporzione, i metodi di concentrazione assoluta, il metodo del rapporto di resistenza (resistance-ratio), con l'utilizzo di terreni solidi, quali Middlebrook 7H10 e LJ <sup>[15]</sup>. Tuttavia, l'esecuzione di test di suscettibilità ai farmaci richiedono, sia su terreno solido, che liquido, in media 3-4 settimane per avere un risultato. Le tecniche molecolari, rispetto ai metodi convenzionali, hanno il vantaggio di essere più rapide e particolarmente utili in caso di sospetta MDR-TB, motivo per cui l'OMS ha approvato la loro esecuzione per l'identificazione rapida di MDR-TB <sup>[16]</sup>. La sensibilità delle varie metodiche molecolari dipende dalla frequenza, nelle diverse aree geografiche, delle singole mutazioni responsabili di resistenza e, nel caso il test venga eseguito direttamente sul campione, dalla quantità di DNA di *M. tuberculosis* presente. La sensibilità del test impiegato direttamente su campioni clinici, sia respiratori che extra-polmonari, è comparabile a quella di ceppi isolati, soltanto quando i campioni sono positivi all'esame microscopico. Nei campioni negativi allo striscio la sensibilità è invece insufficiente. Questi test molecolari si basano sul fatto che, nei bacilli tubercolari, le resistenze vengono acquisite in seguito a mutazioni geniche. La

rifampicina, ad esempio, è un farmaco che agisce a livello della subunità- $\beta$  dell'RNA polimerasi, impedendo allungamento dell'mRNA. Il target in questione è codificato dal gene *rpoB*, per cui mutazioni a suo carico comportano un cambiamento conformazionale della proteina, con conseguente riduzione dell'affinità farmaco-bersaglio. È stato osservato come il 95% dei ceppi resistenti alla rifampicina, presenta mutazioni a carico di una regione di 81 bp (hot-spot) sul gene *rpoB*, che, più frequentemente ricadono sui codoni 526 e 531. Meccanismi molecolari responsabili di resistenza ad altri farmaci di prima e seconda linea, sono invece più complessi. Per l'isoniazide si osservano tipicamente mutazioni a carico del gene *KatG*, soprattutto la mutazione S315T, e del gene *inhA*, più frequentemente a livello del promotore (mutazione 215CT). Si ipotizza anche un coinvolgimento del gene *ahpC*, anche se, in realtà, sembra che una sua iperespressione sia compensatoria per la perdita della catalasi *KatG*. Allo stesso modo i meccanismi molecolari responsabili della resistenza ad altri farmaci di prima linea, come la streptomina (geni *rrs* o *rpsL*, mutazione più frequente K43R), pirazinamide (mutazioni nel gene *pncA*) ed etambutolo (mutazioni del gene *embB* codone 306), ma anche di seconda linea, come fluorochinoloni (gene *gyr-A*, mutazioni Ala-90 e Asp-94 più frequenti), kanamicina e acido para-aminosalicilico, sono ancora parzialmente compresi e necessitano di ulteriori studi [24]. La tecnologia Line Probe Assay (LiPA) consente la rilevazione della farmaco-resistenza, sfruttando l'ibridazione inversa di amplificati, prodotti da una PCR in multiplex, con sonde legate ad un supporto di nitrocellulosa. L'amplificazione del DNA dei bacilli avviene attraverso primer biotinilati; dopo denaturazione i frammenti amplificati marcati con la biotina vengono fatti ibridare alle sonde legate al supporto, in condizioni di elevata stringenza. L'ibridazione viene rilevata mediante l'aggiunta di fosfatasi alcalina coniugata a streptavidina e, successivamente, del substrato per la fosfatasi alcalina. La presenza di mutazioni è indicata dall'assenza di ibridazione di una o più sonde wild-type ed eventualmente dalla presenza di ibridazione di una o più sonde mutate. L'ibridazione e la rilevazione delle strip possono essere automatizzate. Test commerciali, come l'INNO-LiPA Rif Kit TB, permettono la determinazione della resistenza alla rifampicina direttamente su campioni, per lo più respiratori [15]. Altri, come il test Hain Lifescence GenoType, permettono l'identificazione di potenziali *M. tuberculosis* MDR e XDR. La serie GenoType, costituita da diverse tipologie di test, si basa sulla tecnologia delle DNA-strip che consente l'identificazione di

specie e la rilevazione di farmaco-resistenze. Il test GenoType MDRplus consente il rilevamento della resistenza a rifampicina (mutazioni rpoB) e isoniazide (mutazioni a carico dei geni KatG e inhA); il GenoType MDRsl permette la determinazione di resistenze verso fluorochinoloni, aminoglicosidi, peptidi ciclici ed etambutolo. Questi test sono stati convalidati sia per il DNA estratto da colture positive, sia da campioni polmonari positivi allo striscio <sup>[15]</sup>. Il test Xpert MTB / RIF è completamente automatizzato e sfrutta il sistema di strumenti Cepheid GeneXpert. È basato sull'amplificazione di acidi nucleici in campioni respiratori con rilevamento semi-quantitativo di MTC e, contemporaneamente, di mutazioni associate a rifampicina-resistenza <sup>[21]</sup>.

### ***Utilità clinica dei test di amplificazione***

L'utilizzo di test di amplificazione in diagnostica è importante poiché, nonostante la sensibilità inferiore rispetto all'esame colturale, consentono di porre la diagnosi di tubercolosi in tempi brevi <sup>[16]</sup>. Inoltre, in casi con esame microscopico positivo, permettono di verificare l'appartenenza del microrganismo al *M. tuberculosis complex*. Per questo motivo il Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) suggerisce l'uso sistematico dei test di amplificazione su tutti i casi di prima diagnosi con esame microscopico positivo. La rapidità e l'accuratezza della diagnosi influiscono significativamente sulla gestione della malattia tubercolare, permettendo una minore diffusione dell'infezione e una riduzione dei costi associati all'isolamento e al trattamento dei pazienti. Le tecniche di amplificazione per la ricerca di MTC direttamente da campione soffrono, però, di alcune problematiche ancora irrisolte, legate alla presenza di falsi negativi e falsi positivi. L'interpretazione clinica dei risultati ottenuti con i test di amplificazione può talvolta risultare ardua. Un algoritmo interpretativo basato sulla disponibilità di tre campioni di espettorato raccolti in giorni diversi, inizialmente sviluppato dal CDC, è universalmente accettato <sup>[23]</sup>.

### ***4.3 Diagnosi di laboratorio dell'infezione tubercolare latente***

#### ***4.3.1. Il test di intradermoreazione secondo Mantoux***

Il TST (test cutaneo della tubercolina) è un test utilizzato per evidenziare l'esposizione del soggetto a *M. tuberculosis complex*, attraverso l'iniezione intradermica di un derivato proteico purificato (PPD) [25]. Il test fu introdotto per la prima volta nel 1890, con la tubercolina di Koch, ormai caduta in disuso, che era costituita dal prodotto estratto da una coltura di bacilli tubercolari portata ad ebollizione. Nel 1934, Siebert sintetizzò, a partire dalla vecchia tubercolina, un precipitato proteico purificato, il PPD, ovvero una miscela antigenica grezza, condivisa tra *M. tuberculosis*, *M. bovis*, e altri micobatteri non tubercolari (NTM). Il test cutaneo della tubercolina permette di misurare, in vivo, una reazione di ipersensibilità di tipo ritardato, basata sul riconoscimento immunologico degli antigeni micobatterici negli individui esposti, da parte dei linfociti T. Tali antigeni vengono iniettati sotto lo strato epidermico, dove provocano l'infiltrazione di linfociti antigene-specifici e, la produzione e il rilascio di citochine infiammatorie. Questa reazione infiammatoria si traduce nella caratteristica area indurita nel sito di iniezione. In genere, perché la reazione si manifesti, sono necessarie da 2 a 8 settimane dopo l'infezione iniziale con *M. tuberculosis*, tempo necessario al sistema immunitario per reagire al PPD, con conseguente risultato positivo rilevato dal TST. Il test cutaneo viene utilizzato per valutare le persone in caso di sospetta infezione tubercolare latente (LTBI), principalmente in due situazioni:

- nelle indagini per testare i contatti stretti di persone con TBC attiva
- come parte di attività di test mirati in vari gruppi di persone ad alto rischio di TB. Le priorità per i test mirati delle popolazioni ad alto rischio dovrebbero essere basate su dati epidemiologici locali

Chi non dovrebbe essere sottoposto al TST [26]:

- Soggetti con reazioni TST positive e gravi in passato o con ustioni estese o eczema presenti sui siti di test TST, a causa della maggiore probabilità di reazioni avverse o reazioni gravi

- Soggetti con tubercolosi attiva documentata o una storia documentata di un trattamento per l'infezione o la malattia tubercolare in passato. In tali pazienti, il test non è di utilità clinica
- Soggetti con le principali infezioni virali attuali (es. Morbillo, parotite, varicella)
- Coloro che hanno ricevuto vaccinazioni contro il morbillo o altri virus vivi nelle ultime 4 settimane, poiché è stato dimostrato che ciò aumenta la probabilità di risultati TST falsi negativi. Si noti che solo la vaccinazione contro il morbillo ha dimostrato di causare risultati TST falsi negativi, ma sembrerebbe prudente seguire la stessa linea guida di 4 settimane per altre immunizzazioni contro virus vivi: parotite, rosolia, varicella e febbre gialla. Tuttavia, se l'opportunità di eseguire il TST potrebbe essere persa, il TST non dovrebbe essere ritardato per i vaccini con virus vivi poiché si tratta di considerazioni teoriche. (NOTA che un TST può essere somministrato prima o anche lo stesso giorno delle immunizzazioni ma in un sito diverso)

Chi dovrebbe essere sottoposto al TST <sup>[26]</sup>:

- Soggetti con una storia di ricezione di vaccinazioni BCG
- Soggetti con un comune raffreddore
- Donne incinte o che allattano
- Soggetti immunizzati con qualsiasi vaccino lo stesso giorno
- Soggetti immunizzati nelle 4 settimane precedenti con vaccini diversi da quelli elencati in precedenza
- Coloro che forniscono una storia di una reazione TST positiva (diversa dalla formazione di vesciche) che non è documentata
- Soggetti che assumono basse dosi di corticosteroidi sistemici al giorno. In genere è necessaria una dose di steroidi equivalente a  $\geq 15$  mg di prednisone al giorno per 2-4 settimane per sopprimere la reattività della tubercolina

*Somministrazione del TST con tecnica Mantoux* <sup>[25]</sup>

Il TST deve essere somministrato secondo il metodo Mantoux, ovvero tramite iniezione intradermica di 0,1 ml, contenente 5 Unità di PPD (derivato proteico purificato), sulla

superficie volare dell'avambraccio. La lettura deve avvenire dopo 48-72 ore. Prima di eseguire il test è sempre bene informare il paziente e discutere sul perché dell'esecuzione, cosa è coinvolto nella procedura e la necessità del paziente, discutere sulla modalità di esecuzione del test, sulle precauzioni da adottare dopo l'esecuzione del test (es. evitare di graffiare la zona di inoculo, mantenerla pulita e asciutta, non bagnarla, non applicare creme, lozioni, bende adesive) e sulla necessità del paziente di ritornare per la lettura dopo 72 ore. Il test va eseguito iniettando la soluzione di tuberculina sulla superficie dell'avambraccio, a circa 10 cm sotto il gomito con un'inclinazione dell'ago di 5-15 gradi.



*Figura 8 – L'immagine mostra la corretta esecuzione dell'iniezione intradermica, con annessa formazione del pomfo teso e pallido superiormente alla smussatura dell'ago*

È possibile, però, che le persone sensibili alla tuberculina abbiano un'inflammatione localizzata, in genere auto-limitata, sulla quale però non è possibile effettuare una misurazione o interpretazione clinica. Il TST deve essere, quindi, somministrato di nuovo utilizzando una tecnica intradermica adeguata sulla superficie palmare dell'avambraccio. Questo dovrebbe essere fatto immediatamente, non appena ci si accorge che l'iniezione era troppo profonda. Nonostante siano state raramente registrate reazioni allergiche acute (anafilassi, angioderma, orticaria e/o dispnea) è sempre bene avere a disposizione soluzioni di epinefrina cloridrato (1:1000) e altri reagenti per l'uso immediato, qualora si verifici una reazione anafilattica o di ipersensibilità acuta.

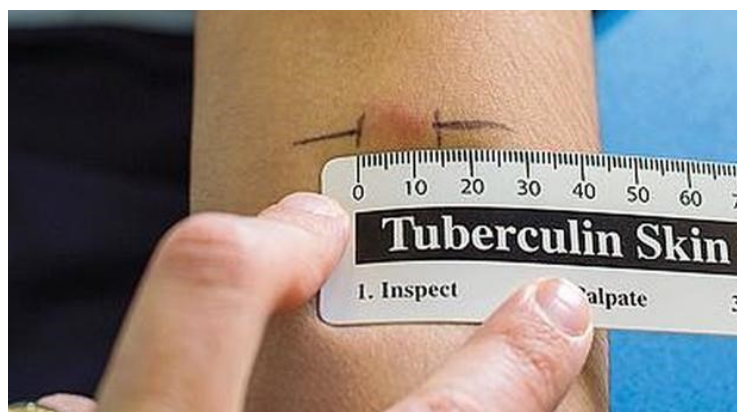
#### *Lettura del test*

Per la lettura dei risultati del test è consigliato l'utilizzo del metodo della palpazione,



dopo 72 ore dalla somministrazione. Le reazioni alla tubercolina possono anche persistere fino a 1 settimana dopo la somministrazione, ma è stato stimato che nel 21% degli individui con una reazione positiva dopo 48-72 ore, questa tenda a negativizzarsi dopo 1 settimana. La lettura va eseguita con l'ausilio di un righello flessibile contrassegnato in millimetri per misurare l'indurimento. La base per leggere il test cutaneo è la presenza o l'assenza di indurimento, ovvero una formazione dura, densa e sollevata. Ci sono casi, circa il 2% -3% delle persone sottoposte al test, in cui nel sito si possono osservare arrossamenti o eruzioni cutanee localizzate (senza indurimento) entro le prime 12 ore. Queste sono reazioni allergiche minori, non gravi, che non indicano un'infezione da TB, non devono essere valutate né misurate. Ciò che deve essere, invece, misurato e registrato è qualunque indurimento presente a 72 ore. Le reazioni al test della tubercolina nel sito di iniezione possono variare da nessun indurimento a un indurimento ampio e ben definito.

I risultati della misurazione vanno riportati in mm del valore del diametro dell'indurimento quando presente.



*Figura 9 – L'immagine mostra un esempio di misurazione di una reazione positiva del TST (indurimento) il cui diametro risulta essere pari a 15 mm*

#### *Interpretazione delle reazioni TST*

L'interpretazione delle reazioni del test cutaneo dipende, non solo dalla misurazione (in millimetri) dell'indurimento, ma anche da altri fattori; motivo per cui è importante considerare molto di più della semplice dimensione della reazione. Piuttosto il risultato dovrebbe essere misurato secondo tre dimensioni <sup>[26]</sup>:

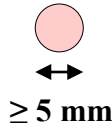
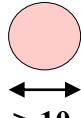
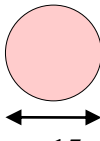
- dimensione dell'indurimento

- valore predittivo positivo
- rischio della persona di contrarre l'infezione da TB o rischio di progressione verso la malattia attiva se infetta da bacilli tubercolari

### *Dimensione dell'indurimento*

Un criterio di 5 mm per una diagnosi di LTBI ha una sensibilità > 98%, ma la specificità è inferiore. Questo criterio viene utilizzato quando è desiderabile la massima sensibilità perché il rischio di sviluppo di una malattia attiva è elevato. Un criterio di 10 mm ha una sensibilità del 90% e una specificità > 95% ed è consigliato per la maggior parte delle situazioni cliniche. Un criterio di 15 mm o più ha una sensibilità solo del 60% -70% ma ha un'elevata specificità (> 95%) nella maggior parte del mondo.

*Tabella 2 - Schematizzazione dei cut-off usati per il TST in relazioni alle categorie di pazienti*

 <b>≥ 5 mm</b>	 <b>≥ 10</b>	 <b>≥ 15</b>
HIV+	Immigrati recenti (entro 5 anni) da paesi ad alta endemia ( <i>ad es. Africa, Asia, Europa orientale, America Latina e Russia</i> )	Persone senza fattori di rischio per TB
Contatti recenti di casi di TB	Tossicodipendenti iniettivi	
Modificazioni fibrotiche alla radiografia del torace compatibili con pregressa TB	Residenti ed impiegati di ambienti e comunità ad alto rischio: prigionie, case di cura, ospedali e istituzioni sanitarie residenziali, rifugi per senza fissa dimora	
Pazienti trapiantati immunodepressi	Personale di laboratorio di micobatteriologia	
	Soggetti con le seguenti patologie e condizioni: silicosi, diabete mellito, insufficienza renale cronica, alcune affezioni oncoematologiche, alcune neoplasie (es carcinoma di testa e collo), riduzione di peso ≥ 10% del peso idenale, gastrectomia, bypass digiunoileale	
	Bambini di età < 4 anni, bambini ed adolescenti esposti ad adulti ad alto rischio	

### Valore predittivo positivo

Come per qualsiasi altro test, i valori predittivi positivo (PPV) e negativo (NPV) del TST dipendono strettamente dalla sensibilità e specificità del test, in particolare dal valore di cut-off scelto, al di sopra del quale il risultato è considerato positivo, e dalla prevalenza della malattia (LTBI) nella popolazione. Per questo le linee guida che regolano l'esecuzione del test della tuberculina nei paesi a bassa prevalenza, considerano l'adozione di valori di cut-off differenti, scelti in base alle categorie di rischio. Un valore limite relativamente basso viene utilizzato per le persone con un'alta probabilità di una precedente esposizione al *M. tuberculosis*; e un valore più alto di cut-off se tale probabilità è bassa. Vengono prese in considerazione anche le differenze nella probabilità di sviluppare la malattia attiva in caso di infezione. È stato dimostrato come il valore predittivo positivo (PPV) del TST vari proporzionalmente alla prevalenza dell'infezione tubercolare nella popolazione, per valori di cut-off di 5, 10 e 15 mm <sup>[28]</sup>. In particolare il PPV aumenta all'aumentare del valore di cut-off utilizzato, nonché all'aumentare della prevalenza dell'infezione. Strettamente dipendente dalle caratteristiche di sensibilità e specificità è la probabilità che si verifichino reazioni false negative o false positive al test, le cui più frequenti cause sono riportate nella Tabella 3 <sup>[27]</sup>.

Tabella 3 - Fattori che causano reazioni false negative o positive

<b>REAZIONI FALSE NEGATIVE</b>	Infezione virale concomitante (p. Es., Morbillo, parotite, varicella, HIV)
	Infezione batterica o fungina concomitante (p. Es., Febbre tifoide, brucellosi, tifo, lebbra, pertosse)
	Fallimento renale cronico, severa malnutrizione, stress
	Bassi stati proteici (p. Es., Grave deplezione proteica, afibrinogenemia)
	Malattie che colpiscono gli organi linfoidei (p. Es., Malattia di Hodgkin, linfoma, leucemia cronica, sarcoidosi)
	Farmaci immunosoppressori (p. Es. inibitori del TNF)
	Bambini di età pari o inferiore a 6 mesi o pazienti anziani (cioè immunità immatura o in calo); Stress (p. Es., Chirurgia, ustioni, malattia mentale, reazioni del trapianto contro l'ospite)
	Conservazione o manipolazione errata dell'antigene, somministrazione errata del test o interpretazione/misurazione errata dei risultati
	Vaccinazioni che utilizzano virus vivi (morbillo, parotite, rosolia, varicella, febbre gialla)
	Recente infezione da tubercolosi
<b>REAZIONI FALSE POSITIVE</b>	Micobatteri non tubercolari (NMT)
	Vaccinazione BCG
	Somministrazione di antigene errato
	Interpretazione errata del risultato

### *Rischio*

Dopo l'infezione da TB primaria, il rischio cumulativo per tutta la vita perché di sviluppi TB attiva stimato è del 10%; la metà di questi si verificherà nei primi 2 anni dopo l'infezione <sup>[26]</sup>. Alcuni fattori aumentano il rischio di riattivazione della tubercolosi a causa della ridotta immunità locale o sistemica. Molte malattie e terapie mediche possono aumentare il rischio di riattivazione, ma il fattore di rischio più forte è l'infezione da HIV. Gli altri problemi sono correlati ad una riduzione o soppressione della funzione immunitaria e includono: diabete, insufficienza renale, malnutrizione, alcuni tipi di cancro, abuso di alcol e fumo di sigaretta. Le terapie mediche che sopprimono la funzione immunitaria sono indicazioni sempre più importanti per il trattamento della LTBI.

### *Effetto booster e TST in 2 fasi*

Il fenomeno del richiamo (*effetto booster*) si verifica principalmente in soggetti anziani che sono stati precedentemente infettati dal *M. tuberculosis*, in cui la capacità del sistema immunitario di reagire agli antigeni tubercolari è diminuita nel tempo <sup>[27]</sup>. La ri-esposizione alla tubercolina, al momento del test cutaneo, eseguito molti anni dopo l'infezione da, può risultare in una reazione negativa iniziale. Tuttavia, se questi soggetti venissero nuovamente testati entro un anno dal primo test, potrebbero avere una reazione positiva. Questo perché il primo TST "attiva la memoria" del sistema immunitario, aumentando la sua capacità di reagire al secondo TST. Può, in casi come questo, sembrare che queste persone siano state infettate tra il primo e il secondo test (recente infezione da tubercolosi); ma in realtà la seconda reazione positiva è una reazione potenziata a causa dell'infezione tubercolare contratta molto tempo prima. Queste persone possono ancora essere prese in considerazione per il trattamento per LTBI se rientrano in una categoria ad alto rischio per la progressione verso la malattia attiva. Per questo motivo si utilizzano test seriali, in grado di rilevare nuovi casi di infezione tra popolazioni ad alto rischio come operatori sanitari o contatti di casi di TB polmonare con TST negativo nella valutazione iniziale. Si presenta in questi casi un problema: l'aumento delle dimensioni della reazione al secondo TST è causato dalla riattivazione di un'ipersensibilità ritardata definita da una precedente infezione a *M. tuberculosis* o alla vaccinazione BCG che si affievolisce negli anni o a una nuova infezione? A causa di questo problema, alcuni centri con un'alta prevalenza di TB preferiscono utilizzare un

TST in due fasi. Il test in due fasi permette di ridurre la probabilità che una reazione potenziata venga male interpretata come un'infezione recente. Questo approccio dovrebbe essere utilizzato in casi in cui il test cutaneo richieda un'esecuzione periodica in categorie ben definite, come gli operatori sanitari. Se la reazione al primo TST è interpretata come negativa, si vede necessaria la ripetizione del test dopo 1-3 dal primo test. Una reazione negativa al secondo test indica che probabilmente il soggetto in questione non ha contratto un'infezione tubercolare, si ripeterà, quindi, il test ad intervalli regolari. In caso di positività al secondo TST, questa potrebbe rappresentare una reazione potenziata. Sulla base di questo secondo risultato del test, la persona dovrebbe essere classificata come precedentemente infetta. Tale positività non viene considerata come una conversione del test cutaneo o una nuova infezione da tubercolosi; tuttavia, il paziente può ancora essere un candidato per il trattamento con LTBI.

#### ***4.3.2. Interferon-Gamma Releasing Assay (test IGRA)***

Gli IGRA (Interferon-Gamma Release Assays) sono in grado di rilevare la reattività immunitaria da parte dei linfociti T, nei confronti di antigeni specifici di *M. tuberculosis*. Le cellule immunitarie, in caso di precedente infezione, vengono stimulate dal contatto con gli antigeni del bacillo tubercolare a produrre e rilasciare interferone-gamma, una citochina infiammatoria quantitativamente misurabile su sangue intero, indice di una precedente infezione <sup>[29]</sup>. La miscela di antigeni utilizzata contiene ESAT-6 (Early Secreted Antigen Target 6) e CFP-10 (culture filtrate protein 10). Entrambi gli antigeni sono codificati da una regione genomica denominata RD1 (Region of Difference 1), specifica per *M.tuberculosis*, ma assente nel BCG e nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari, ad eccezione di *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. szulgai*. Al momento, sul mercato, esistono due tipologie di test diagnostici indiretti *in vitro*:

- QuantiFERON®-TB Gold In-Tube test (QFT-GIT)
- T-SPOT®.TB test (T-Spot)

Entrambi sono approvati dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA) e dalla Health Canada; presentano inoltre la marcatura CE (Conformité Européenne) che consente il loro utilizzo in Europa <sup>[30]</sup>.

Il sistema QuantiFERON®-TB Gold utilizza provette per la raccolta del sangue al cui interno sono presenti antigeni rappresentativi di *M. tuberculosis* e i rispettivi controlli. Dopo la raccolta del campione (sangue intero), le provette vengono incubate a 37 °C per 24 ore. Al termine dell'incubazione, vengono centrifugate, il plasma raccolto e la quantità di IFN- $\gamma$  eventualmente prodotta, misurata mediante saggio ELISA. I risultati per i campioni sono riportati in unità internazionali (UI) per millilitro, definite in relazione ad una curva standard costruita con diluizioni dello standard secondario fornito dal produttore [15]. Un individuo è considerato positivo per l'infezione da *M. tuberculosis* se la risposta IFN-gamma agli antigeni TB è superiore al cut-off (dopo aver sottratto al risultato la risposta di fondo del controllo negativo) [30].

Il T-SPOT.TB sfrutta un saggio di immuno-adsorbimento enzimatico, che utilizza linfociti T, purificati ed enumerati, che reagiscono in presenza degli antigeni specifici ESAT-6 e CFP-10 [15]. Per la procedura, le cellule mononucleate (PBMC) vengono separate da un campione di sangue intero e contaminate, così da poterne utilizzare un numero standardizzato. Le PBMC vengono incubate con gli antigeni specifici, al fine di stimolare eventuali linfociti T sensibilizzati presenti a produrre e secernere l'IFN- $\gamma$  che verrà catturato da anticorpi specifici sulla membrana alla base del pozzetto. Un secondo anticorpo, coniugato ad un enzima (fosfatasi alcalina) e diretto verso un epitopo diverso della molecola IFN- $\gamma$ , viene aggiunto. Quest'ultimo si lega alla citochina catturata sulla superficie della membrana. Segue l'aggiunta di un substrato solubile, il quale, scisso dall'enzima, forma un precipitato insolubile nel sito della reazione. Ogni spot rappresenta quindi l'impronta di una singola cellula T secernente IFN- $\gamma$ ; ciò permette di definire il numero di cellule T sensibilizzate verso gli antigeni di *M. tuberculosis* presenti nel sangue periferico. Il risultato di un test IGRA viene espresso come positivo o negativo, valutazione definita rispetto ad un cut-off [40]. Può essere influenzato:

- dalla vitalità delle cellule nel campione che può vedersi alterata in caso di errori tecnici, di trasporto improprio o di una spiccata linfopenia
- dal trattamento con farmaci antitubercolari

Tra i vantaggi associati all'esecuzione di IGRA:

- Richiedono un'unica visita del paziente
- I risultati sono disponibili anche in 24 ore
- Non si manifesta effetto booster in test ripetuti (seriali)

- No false positività da BCG

Come per ogni test diagnostico si considerano anche diversi svantaggi:

- Necessità di eseguire un prelievo di sangue venoso, operazione che può risultare difficile in paesi in via di sviluppo
- Logistica del trasporto del prelievo di sangue dalla sede del prelievo al laboratorio mantenendo temperatura e conservazione idonee
- Scarsa conoscenza attuale sul valore predittivo del test per lo sviluppo di tubercolosi attiva e sull'influenza del trattamento
- Variabilità nella riproducibilità dei dati per valori vicini al cut-off
- Costo elevato rispetto alla intradermoreazione di Mantoux
- Non consentono la differenziazione tra LTBI e malattia tubercolare attiva

#### *Sensibilità e specificità degli IGRA:*

Considerando l'assenza di un *gold standard* per l'identificazione di LTBI, la specificità degli IGRA viene stimata sulla base di uno standard di riferimento surrogato. Quando si utilizzano come standard di riferimento casi di tubercolosi attiva, confermati dalla coltura, la specificità degli IGRA è superiore al 95% per la diagnosi di LTBI in ambienti con bassa incidenza di TBC <sup>[30]</sup>. La specificità degli IGRA risulta, invece, maggiore rispetto al TST soprattutto in persone vaccinate con BCG, considerando il vantaggio di non fornire risultati falsi positivi in caso di vaccinazione BCG o infezione da micobatteri non tubercolari <sup>[40]</sup>. La specificità di IGRA e TST è simile nelle popolazioni non vaccinate con BCG (97%). Tra le popolazioni in cui viene somministrato il BCG, la specificità è molto più bassa (circa il 60%) e variabile, a seconda di quando e quanto spesso viene somministrato. La sensibilità per il test T-SPOT.TB sembra essere superiore a quella per il test QFT o TST (circa il 90%, 80% e 80%, rispettivamente) <sup>[30]</sup>. Poiché gli IGRA non sono influenzati dalla vaccinazione BCG, sono utili per la valutazione delle LTBI nei paesi in cui la vaccinazione viene somministrata dopo l'infanzia o in cui vengono somministrate vaccinazioni multiple (booster). Sebbene ciò sia basato su prove limitate, gli IGRA sembrano non essere influenzati dalla maggior parte delle infezioni da NTM che possono causare TST falsi positivi. Tuttavia, l'infezione da *M. marinum* o *M. kansasii*, che esprimono ESAT-6 o CFP-10, ha dimostrato di produrre risultati positivi in

IGRA, così come con il TST. È stato inoltre osservato come la sensibilità degli IGRA venga ridotta in presenza di infezione da HIV <sup>[31]</sup>: conteggi inferiori alla soglia di linfociti CD4+ sono stati associati ad un aumento di risultati IGRA indeterminati soprattutto con il test QFT-GIT, ma non si sono osservate differenze con significatività statistica con il T-SPOT.TB. Un risultato indeterminato invalida il test; questo è spesso legato alla soppressione immunitaria che porta alla mancanza di risposta dei linfociti T. Un risultato IGRA indeterminato dovrebbe essere ripetuto per assicurarsi che non ci siano difetti tecnici o di laboratorio.

### *Riproducibilità*

Nonostante per gli IGRA sia stata definita una specificità maggiore rispetto al TST, sono stati osservati problemi relativi alla riproducibilità del test, che si è visto essere suscettibile alla variabilità di numerosi fattori, a diversi livelli, tra cui la fabbricazione dei test, la fase pre-analitica, analitica e fattori immunologici; come si può osservare nella Tabella 4. Questo implica l'impossibilità di utilizzare un unico valore di cut-off per distinguere risultati negativi e positivi, nonché per definire la conversione in soggetti sottoposti a test seriali. Si vede, quindi, necessario un riesame dei valori di cut-off e l'introduzione di zone di confine (in particolare per il saggio QFT-G) che potrebbero contribuire a migliorare la riproducibilità e il valore diagnostico del test <sup>[35]</sup>.

*Tabella 4 – Cause di variabilità che influenzano la riproducibilità dei test IGRA*

<p>VARIABILITÀ FABBRICAZIONE TEST</p>	<p>Alterazioni a carico di lotti o reagenti (es. temperatura inadeguata durante la spedizione). Errori a livello della fabbricazione da parte delle ditte produttrici comporta alterazioni dei risultati. Un esempio si ebbe negli Stati Uniti quando ci fu, per il test QFT, un aumento dei positivi dal 10% al 31% a causa di un errore, non identificato, in un lotto. Una possibile soluzione riguarda il miglioramento dei controlli di qualità sui lotti da parte del produttore <sup>[35]</sup></p>
<p>VARIABILITÀ PRE-ANALITICA</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ritardo tra la raccolta del sangue e l'incubazione delle cellule a 37 °C Il produttore del saggio QFT consente un intervallo di ritardo da 0 a 16 ore <sup>[33]</sup></li> <li>- volume del sangue, agitazione della provetta e tempi d'incubazione <sup>[34]</sup></li> <li>- Variazioni nei tempi di raccolta del sangue (sera contro mattina) può anche introdurre variabilità nei risultati dei test, ma il meccanismo non è chiaro</li> </ul>



VARIABILITÀ ANALITICA	<p>Sono alterazioni legate per lo più a fonti casuali che persistono nonostante gli sforzi per migliorare la riproducibilità del test.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- fluttuazioni nelle misurazioni dovute ad errori casuali causati dall'interferenza di fattori incontrollati nei fluidi biologici (effetti della matrice)</li> <li>- imprecisione della pipettatura</li> <li>- errori di manipolazione nella centrifugazione</li> <li>- decantazione e lavaggio</li> <li>- l'imprecisione della misura del segnale finale</li> </ul>
VARIABILITÀ IMMUNOLOGICA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- immunoamplificazione, se i test IGRA vengono eseguiti 3 giorni dopo il TST <sup>[35]</sup></li> <li>- immunomodulazione attraverso prodotti microbici conservati noti come modelli molecolari associati agli agenti patogeni (PAMP), come il lipopolisaccaride e il peptidoglicano <sup>[36]</sup></li> </ul>

### *Valore predittivo per la progressione a malattia tubercolare attiva*

L'evidenza esistente suggerisce che gli IGRA, così come il TST, sono test accettabili, ma imperfetti poiché non sono in grado di distinguere accuratamente tra LTBI e TB attiva, tra riattivazione e reinfezione, o predire con precisione la progressione da LTBI a malattia attiva. Come mostrato in una recente revisione sistematica <sup>[37]</sup>, né gli IGRA né il TST presentano un'elevata accuratezza per la previsione della TB attiva, sebbene l'uso di IGRA in alcune popolazioni potrebbe ridurre il numero di persone considerate per il trattamento preventivo (grazie alla maggiore specificità). In questo studio l'abilità prognostica degli IGRA è stata definita sulla base del calcolo dei rapporti d'incidenza per i tassi di progressione in individui IGRA-positivi, rispetto a individui IGRA-negativi. I soggetti considerati nello studio prendevano in considerazione adulti e bambini, con o senza infezione da HIV, che non presentavano una tubercolosi attiva all'inizio dello studio, con un follow-up di 4 anni. Diversi studi longitudinali presi in considerazione nella revisione mostrano che i tassi di incidenza della TB attiva, anche negli individui IGRA positivi nei paesi con un elevato carico di TB, sono bassi. Ciò suggerisce che nella stragrande maggioranza (> 95%) negli individui IGRA-positivi non vi è alcuna progressione a malattia attiva durante il follow-up. Questo è simile al TST. Nel complesso, i dati attualmente disponibili mostrano che il valore predittivo degli IGRA per la progressione verso la tubercolosi è basso e leggermente, ma non significativamente, superiore a quello del TST. Vi sono anche prove limitate che suggeriscono che la conversione IGRA rilevata utilizzando test multipli può avere un valore predittivo maggiore rispetto ai singoli risultati IGRA in quanto può indicare un'infezione recente.

Per quanto riguarda le popolazioni ad alto rischio (ad es. gli individui infetti da HIV) attualmente non esistono dati che suggeriscano che gli IGRA siano migliori nel prevedere la tubercolosi attiva in questo gruppo rispetto al TST. Una meta-analisi e revisione sistematica più recente <sup>[41]</sup>, basata su 40 studi preselezionati, sostiene che gli IGRA presentino un RR (risk ratio) per la progressione a malattia attiva, valore predittivo positivo (PPV) e valore predittivo negativo (NPV) maggiore rispetto al TST. A sostegno di quest'affermazione, nello studio in questione, si osserva come la percentuale di individui positivi agli IGRA e al TST con progressione a malattia attiva, non sia significativamente diversa dal PPV degli IGRA. I risultati in questione differiscono da quelli della meta-analisi condotta da Rangaka e colleghi, precedentemente riportata. Questo perché i risultati ottenuti e descritti potrebbero essere associati ad una sottovalutazione, perché gli autori non hanno escluso gli individui trattati dalla loro analisi. Il rischio di sviluppare la tubercolosi dopo l'infezione dipende da fattori ambientali, fattori genetici, malattie concomitanti, farmaci immunosoppressori e lo stato immunologico dell'ospite. Pertanto, nessun test esistente può prevedere con precisione la progressione delle LTBI verso la tubercolosi attiva. Tuttavia, nella revisione sistematica sono state raccolte e analizzate prove più stabili rispetto alle pubblicazioni precedenti riguardo al valore predittivo dell'IGRA, superiore a quello del TST. L'utilizzo degli IGRA per ricercare soggetti con un'infezione tubercolare latente, identificati come possibili candidati al trattamento preventivo, richiede delle accortezze finalizzate a massimizzare la qualità dei risultati tra diversi sottogruppi all'interno della popolazione. Tra questi si ricordano:

*- Soggetti Immunocompromessi*

Costituiscono un gruppo eterogeneo che include pazienti con una ridotta competenza immunitaria causata da molteplici fattori, tra cui: un sistema immunitario immaturo (es. bambini), difetti immunitari genetici o acquisiti, immunosoppressione associata ad infezioni, tumori maligni, o indotta dal trattamento (es. trattamento con inibitori del TNF-alfa). È essenziale, in questi casi, massimizzare la sensibilità del test per identificare correttamente il maggior numero possibile di individui veramente infetti. Nei pazienti immunocompromessi, è stato dimostrato come le risposte IGRA siano ridotte rispetto a soggetti immunocompetenti, a tal punto da produrre una percentuale maggiore di risultati indeterminati. La presenza di controlli positivi durante l'esecuzione di IGRA consente la

valutazione delle prestazioni del test misurando la capacità dei linfociti T del campione di produrre IFN-  $\gamma$ , una funzione che può essere compromessa nei pazienti immunocompromessi. È quindi importante considerare le situazioni variabili; ad esempio per soggetti sottoposti a dialisi cronica è stata stimata una sensibilità del 71.4% per QFT-GIT e 22-78.6% per T-SPOT.TB; e una specificità del 100% per QFT-GITe del 41.9-61.2 per T-SPOT.TB [15].

- *Pazienti con infezione da HIV*

La co-infezione da HIV / TB aumenta il rischio di sviluppare una TB attiva: è stato dimostrato che il rischio di sviluppare una TB attiva raddoppia entro la fine del primo anno di infezione da HIV. Le prove attuali suggeriscono che gli IGRA si comportano in modo simile al TST nell'identificare casi di LTBI in individui con concomitante infezione da HIV. Entrambi i test hanno un valore predittivo modesto e una sensibilità non ottimale. Sebbene T-SPOT sembri essere meno influenzato dall'immunosoppressione rispetto a QFT-GIT e TST, nel complesso, le differenze tra i tre test erano minime o inconcludenti [15]. In una revisione e meta-analisi [31] soggetti con tubercolosi attiva confermata dalla coltura, sono stati considerati come standard di riferimento surrogato per le LTBI. In queste condizioni le stime di sensibilità raggruppate risultavano eterogenee, ma più alte per le TSPOT (72%, 95% CI 62-81%) che per le QFT-GIT (61%, 95% CI 41-75%) in zone con bassa/media incidenza; in regioni, invece, con una più alta incidenza la sensibilità del T-SPOT.TB era del 94% (95% CI 73-100%), mentre per QFT-GIT si aveva una sensibilità del 67% (47-83%), molto simile alla sensibilità del TST.

- *Screening degli operatori sanitari professionali*

L'uso di IGRA in sostituzione del TST per lo screening una tantum può comportare una minore prevalenza di test positivi e un minor numero di operatori sanitari che richiedono un trattamento con LTBI, soprattutto in contesti di bassa incidenza di TB [30]. Per categorie con maggiore rischio di infezione, come gli operatori sanitari si prediligono test seriali al fine di individuare infezioni tubercolari recenti e identificare i soggetti da sottoporre al trattamento preventivo. Diversi studi riguardanti l'utilizzo di IGRA negli operatori sanitari sono stati valutati e riassunti in revisioni sistematiche [39]. Tuttavia, è stato osservato in numerosi studi che, quando vengono utilizzati i valori limite definiti dal produttore, gli IGRA hanno avuto alti tassi di conversione (2% -5%), molto spesso più alti dei tassi di conversione nel TST e superiori al rischio annuale di infezione tubercolare

previsto dalle impostazioni di incidenza. Gli IGRA avevano anche alti tassi di reversioni spontanee, che variavano da circa il 20% al 60% nella maggior parte degli studi [26]. I programmi di test occupazionali dovranno quindi standardizzare i protocolli di test IGRA per limitare la variabilità dei risultati (e sono stati proposti suggerimenti per la standardizzazione) [30].

#### - *Bambini*

La diagnosi di TB attiva nei bambini è particolarmente impegnativa in quanto segni e sintomi possono essere confusi con altre malattie infantili e i sintomi clinici possono essere assenti. Inoltre, i campioni di espettorato sono più difficili da ottenere dai bambini e solo il 10-15% dei casi di tubercolosi attiva nei bambini viene diagnosticato mediante colorazione di striscio acido-resistente. La diagnosi di TB quindi di solito si basa su un composto di diversi test diagnostici. Talvolta per la diagnosi vengono aggiunti TST e IGRA; i risultati positivi sono indice di un aumento del rischio di tubercolosi. Nella revisione sistematica TBNET / ECDC e nella meta-analisi che valuta l'accuratezza (specificità, NPV e PPV) degli IGRA nella diagnosi di LTBI, solo un numero limitato di studi ha affrontato specificamente l'uso degli IGRA nei bambini. Da tali studi risulta una specificità (IC 95%) per QFT-GIT, T-SPOT. TB e il TST rispettivamente del 100% (91-100%), 98% (87-100%) e 55% (38-71%). Gli autori della revisione sistematica e della meta-analisi TBNET / ECDC hanno sottolineato il numero particolarmente basso di studi che affrontano le prestazioni degli IGRA nella diagnosi di LTBI nei bambini e l'urgente necessità di studi su larga scala per valutare gli IGRA in questo gruppo vulnerabile. Complessivamente, i pochi studi che affrontano l'accuratezza degli IGRA nella diagnosi di LTBI nei bambini suggeriscono come la specificità degli IGRA sia superiore a quella del TST. Nella diagnosi di TB attiva, la bassa sensibilità e specificità non sembrano supportare il ruolo degli IGRA come test di esclusione per la TB attiva e indicano l'inadeguatezza di quest'ultimi per differenziare i bambini con LTBI dai bambini con TB attiva. In generale, sono necessari più studi sui bambini che affrontano l'accuratezza degli IGRA nella diagnosi di LTBI e TB attiva, in particolare nei bambini di età inferiore ai cinque anni, che sono a maggior rischio di scarso esito clinico dopo lo sviluppo di una malattia attiva [15]

#### - *Soggetti vaccinati con BCG e non vaccinati*

In una revisione sistematica e una meta-analisi pubblicata nel 2008 <sup>[38]</sup>, è stata confrontata la specificità degli IGRA nelle popolazioni non vaccinate con BCG e vaccinate con BCG. Come riportato nella revisione sistematica in questione la specificità per QFT-TB era del 99% (CI, 98% to 100%) in soggetti non vaccinati con BCG, e del 96% (CI, 94% to 98%) in individui vaccinati. La specificità per T-SPOT. TB e per TST in soggetti non vaccinati con BCG (o prevalentemente non vaccinati) è rispettivamente del 100% e del 97%. La specificità per T-SPOT. TB e la specificità aggregata per TST negli individui vaccinati con BCG (o prevalentemente vaccinati) era dell'84,7% e del 59%, rispettivamente. Tuttavia, è bene tenere conto che i valori per T-SPOT. TB si basano su un solo studio, motivo per cui gli autori hanno sottolineato la quantità limitata di dati su questo test.

#### ***4.4 Linee guida sull'utilizzo dei test IGRA***

Data la crescente disponibilità di studi e prove riguardo l'utilizzo di IGRA, molte linee guida nazionali ora includono questi test per la diagnosi di LTBI, anche se la maggior parte dei paesi continua a raccomandare e utilizzare TST. Una recente revisione, pubblicata nel 2011 <sup>[42]</sup>, analizzando 33 linee guida provenienti da 25 paesi diversi e 2 istituzioni sovranazionali, ha rilevato una notevole diversità di approcci. Tra questi risaltano però quattro approcci più comunemente adottati:

- approccio in due fasi con TST iniziale, seguito da IGRA, o quando l'esito del TST è negativo (per aumentare la sensibilità, principalmente in individui immunocompromessi), o quando è positiva (per aumentare la specificità, soprattutto negli individui vaccinati con BCG)
- TST o IGRA, ma non entrambi
- IGRA e TST insieme (per aumentare la sensibilità)
- solo IGRA, in sostituzione del TST

Come sottolineato nel report pubblicato dal CDC nel 2010 <sup>[24]</sup>, prima di implementare IGRA in un programma di sorveglianza e controllo della malattia tubercolare, si deve valutare la disponibilità, il costo complessivo e i benefici del test in relazione alle caratteristiche della popolazione da testare.

Di seguito si riportano le raccomandazioni, differenziate in relazione alle categorie della popolazione da testare per LTBI, proposte dal CDC (USA) <sup>[24]</sup>, dall'ECDC <sup>[44]</sup> e dal

Canadian Tuberculosis Committee (CTC, Canada) <sup>[43]</sup>.

- **Utilizzo di IGRA per la diagnosi TB attiva**

- **CTC** <sup>[43]</sup> → gli standard canadesi non raccomandano l'utilizzo di IGRA per rilevare la TB attiva negli adulti, mentre nei bambini, di età inferiore ai 18 anni e con sospetta TBC, gli IGRA possono essere utilizzati come ausilio diagnostico in combinazione con altre indagini, poiché in grado di fornire informazioni utili a sostegno della diagnosi. Tuttavia, l'IGRA non deve essere un sostituto dei metodi diagnostici classici, soprattutto perché un IGRA negativo, come anche un TST negativo, non esclude la presenza di tubercolosi attiva, a qualsiasi età, in particolar modo nei bambini piccoli
- **ECDC** <sup>[44]</sup> → analogamente agli standard canadesi, l'ECDC afferma l'impossibilità dell'utilizzo di IGRA in sostituzione dei metodi diagnostici standard per la diagnosi di TB attiva. Nella maggior parte delle situazioni cliniche non hanno valore aggiunto, ma in particolari casi (es. pazienti con tubercolosi extra-polmonare, pazienti con esame microscopico, o colturale, dell'espettorato negativo, diagnosi di TB nei bambini, o nella diagnosi differenziale di NTM) possono fornire informazioni aggiuntive necessarie, in combinazione con altri test per la diagnosi di TB
- **USA – CDC** <sup>[24]</sup> → gli IGRA sono approvati dalla FDA (*Food and Drugs Administration*) come test indiretti per l'infezione da *M. tuberculosis* (compresa l'infezione che provoca una malattia attiva) se utilizzati in combinazione con la valutazione del rischio, la radiografia e altre valutazioni mediche e diagnostiche

- **Utilizzo di IGRA per tracciamento dei contatti con casi di TB attiva**

Le linee guida nazionali sull'uso di IGRA nel tracciamento dei contatti *per gli adulti* favoriscono principalmente un approccio di test in due fasi. Si esegue un TST nella prima fase e, se positivo, si procede con un IGRA. L'approccio in 2 fasi è finalizzato ad aumentare la specificità in soggetti con BCG e per ridurre i costi relativi a follow-up e trattamento preventivo in caso di falsi positivi.

- **CTC** <sup>[43]</sup> → In Canda si utilizza un approccio differenziato in base al rischio del paziente: per individui con un'esposizione ad alto rischio o un rischio elevato di progressione a malattia attiva, si procede con entrambi i test (IGRA e TST) per aumentare la sensibilità, mentre per casi con rischio medio-basso si adotta un

approccio in 2 fasi, con il TST eseguito per primo. Gli IGRA possono essere utilizzati conferma, in caso di TST positivo, nei contatti (adulti o bambini) che, considerata la durata e il grado di contatto con un caso infettivo attivo, si ritiene abbiano una bassa probabilità di LTBI acquisita di recente, in assenza di fattori che aumentano il rischio di progressione verso la malattia attiva. Per i contatti ravvicinati o che presentano un rischio elevato o aumentato di progressione verso la malattia attiva, si deve utilizzare un TST (o entrambi TST e IGRA). Se entrambi sono positivi, si deve considerare l'elevata probabilità che il soggetto abbia LTBI. Se si utilizzano sia TST che IGRA, si raccomanda di prelevare il campione ematico per IGRA prima del giorno in cui si legge il TST, se possibile

- **ECDC** <sup>[44]</sup> → Le prove disponibili indicano la possibilità di utilizzare gli IGRA negli algoritmi di tracciamento a contatto che sfruttano l'approccio in due fasi. Il rischio di progressione verso la tubercolosi attiva è massimo nei primi anni successivi all'infezione, infatti la diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis* in individui che sono stati a contatto con casi di tubercolosi attiva è particolarmente importante al fine di fornire loro un trattamento preventivo adeguato. L'approccio in due fasi nella diagnosi di LTBI consiste comunemente nell'eseguire il TST, seguito da un test IGRA per migliorare la sensibilità e la specificità dei risultati positivi.
  - **USA – CDC** <sup>[24]</sup> → Un IGRA o un TST possono essere utilizzati, senza preferenza, per testare i contatti recenti di individui con tubercolosi attiva sospetta o confermata. Gli IGRA offrono la possibilità di rilevare l'infezione da *M. tuberculosis* con maggiore specificità rispetto al TST, inoltre non sono soggetti ad effetto booster e possono essere completati dopo una singola visita del paziente. Tuttavia si raccomanda, in caso di utilizzo di IGRA nelle indagini per contatto, la conferma dei risultati negativi ottenuti prima di 8 settimane dopo la fine dell'esposizione attraverso la ripetizione del test 8-10 settimane dopo l'esposizione. Questa raccomandazione è simile a quella usata per la TST, perché i dati sui tempi di conversione degli IGRA dopo una nuova infezione non sono attualmente disponibili, e in questo modo è possibile ridurre al minimo il numero di conversioni che si verificano a seguito di differenze del test
- **Utilizzo di IGRA in soggetti immunocompromessi**

- **CTC** <sup>[43]</sup> → In soggetti immunocompromessi (adulti o bambini), il TST dovrebbe essere utilizzato come test iniziale per rilevare LTBI. Se l'esito è positivo, si considera la probabilità che l'individuo presenti LTBI. Tuttavia, alla luce del noto problema dei falsi-negativi di TST nelle popolazioni immunocompromesse, in caso di esito negativo di TST si può procedere con IGRA per confermare o meno l'esito iniziale. Se IGRA è positivo, si considera la presenza di LTBI. Se il risultato è indeterminato, si deve ripetere il test per escludere errori di laboratorio. Se il test è nuovamente indeterminato, il clinico dovrebbe fare affidamento sulla storia della persona, le caratteristiche cliniche, e qualsiasi altro risultato di laboratorio per prendere una decisione sulla probabilità di LTBI.
- **ECDC** <sup>[44]</sup> → Gli individui immunocompromessi rappresentano un gruppo eterogeneo che comprende, pazienti che ricevono un trattamento immunosoppressivo e pazienti con disturbi da immunodeficienza, come malattie renali croniche o infezione da HIV. Poiché è essenziale massimizzare la sensibilità negli individui immunocompromessi, l'uso simultaneo di TST e IGRA potrebbe essere utile per identificare le LTBI. I risultati positivi TST o IGRA dovrebbero essere presi in considerazione nel contesto di una valutazione globale del rischio quando si considera un trattamento preventivo. L'IGRA dovrebbe quindi essere utilizzato come parte di una valutazione completa del rischio in questo gruppo di pazienti, considerato l'elevato rischio di morbilità e mortalità della TBC. Nei pazienti HIV-positivi, in particolare, è raccomandato eseguire l'indagine il prima possibile, prima di un declino di CD4 tale da influenzare i risultati di IGRA.
- **USA – CDC** <sup>[24]</sup> → i risultati ottenuti dall'esecuzione di entrambi, TST e IGRA, potrebbero essere utili quando il test iniziale è negativo e quando il rischio di infezione, di progressione e di esito negativo sono aumentati, come appunto in soggetti con infezione da HIV. In tali pazienti è possibile aumentare la sensibilità di rilevamento con l'esecuzione di entrambi i test, tuttavia, molteplici risultati negativi di qualsiasi combinazione di test non possono escludere l'infezione da M. tubercolosi.

#### **- Utilizzo di IGRA per lo screening negli immigrati**

Nei paesi a bassa incidenza, la maggior parte dei casi di tubercolosi si verifica tra gli immigrati recenti e i nati all'estero, per questo lo screening degli immigrati è spesso una componente chiave del controllo della tubercolosi. Alcune delle linee guida di paesi a bassa incidenza, che includono raccomandazioni su immigrati provenienti da



ambienti ad alta incidenza, includono anche raccomandazioni per immigrati che rientrano tra le categorie con maggior rischio di sviluppare malattia attiva (ad es. bambini o individui con una malattia concomitante che li predispone a una riattivazione di LTBI) indipendentemente dal loro paese di origine. Tutte le linee guida che fanno raccomandazioni per lo screening degli immigrati incorporano IGRA, l'algoritmo più comune è un TST seguito da un IGRA se positivo, allo scopo di aumentare la specificità dato l'uso diffuso della vaccinazione BCG nei paesi in cui la TBC è endemica.

- **CTC** <sup>[43]</sup> → Lo screening di routine o di massa per LTBI di tutti gli immigrati (adulti e bambini), con TST o IGRA, non è raccomandato. Tuttavia, lo screening mirato per LTBI dopo l'arrivo in Canada è raccomandato tra gli individui nati all'estero e i viaggiatori (adulti e bambini) con fattori di rischio per la riattivazione delle LTBI. Devono ricevere screening i soggetti con recente infezione da TB ( $\leq 2$  anni), bambini con età inferiore a 15 anni che hanno vissuto in regioni ad alta prevalenza e sono immigrati negli ultimi 2 anni, soggetti di 15 anni o più che hanno vissuto in regioni ad alta prevalenza, sono immigrati negli ultimi 2 anni e hanno vissuto con o in contatto con un caso noto di tubercolosi o che sono ad alto rischio di sviluppo di tubercolosi attiva. Per i viaggiatori Il test IGRA di conferma non è raccomandato in quanto casi con TST post-viaggio positivo sono considerati convertitori recenti o ad alto rischio di riattivazione.
- **ECDC** <sup>[44]</sup> → in un report pubblicato in merito al controllo delle malattie infettive negli immigrati si esorta lo screening per LTBI con TST o IGRA subito dopo l'arrivo, per tutte le popolazioni migranti da paesi ad alta incidenza di TBC e con conseguente applicazione del protocollo di trattamento preventivo, se indicato <sup>[45]</sup>.
- **USA – CDC** <sup>[24]</sup> → tutti i rifugiati appena arrivati devono essere testati con TST o IGRA, se i test non sono già stati eseguiti prima della partenza. Per bambini di 2-14 anni di età, provenienti da paesi con un'incidenza di TBC  $>20/100\ 000$  vengono sottoposti ad un TST o IGRA nel contesto pre-arrivo. Nell'impostazione successiva all'arrivo, gli individui che potrebbero essere infettati da *M. tuberculosis* e che presentano un rischio intermedio o elevato di progressione della malattia dovrebbero essere sottoposti, con priorità allo screening e al trattamento per LTBI <sup>[46]</sup>. Il TST può essere utilizzato come sostituto dell'IGRA, quando l'utilizzo di quest'ultimo non è

autorizzato da parte del paese di provenienza; o nei bambini di età inferiore a 2 anni (quando è indicato il test). Il TST deve essere ripetuto se non è disponibile una documentazione specifica di un risultato precedente; tuttavia, se il soggetto segnala una storia di reazione grave precedente a un TST (ad esempio, vesciche, ulcerazione), ripetere il test è controindicato. Va notato che un TST o IGRA negativo non elimina la malattia di TBC dalla diagnosi differenziale in un paziente con segni o sintomi di malattia di TBC.

- **Utilizzo di IGRA per lo screening negli operatori sanitari**

- **CTC** <sup>[43]</sup> → Non ci sono pubblicazioni sufficienti per raccomandare test IGRA seriali in popolazioni esposte alla tubercolosi, come operatori sanitari o personale carcerario e detenuti. Lo screening seriale per LTBI dovrebbe continuare ad essere effettuato utilizzando il TST, come raccomandato dalle norme canadesi sulla tubercolosi. Gli IGRA possono essere utilizzati come test di conferma per una TST di riferimento positiva in un operatore sanitario immunocompetente o nel personale penitenziario/detenuto che si ritiene abbia una bassa probabilità di LTBI e non presenti un rischio elevato per la progressione a malattia attiva in caso di infezione se infette, o non è in trattamento con glucocorticoidi o inibitori anti-TNF-alfa e non sia affetto da diabete mellito. Soggetti con un risultato positivo di IGRA possono essere considerati per il trattamento di LTBI. In caso di IGRA negativo, l'individuo potrebbe essere nuovamente sottoposto al test, se si verifica un'esposizione (ad es. test post-esposizione). In assenza di dati sui tempi ottimali per i test IGRA post-esposizione, la finestra temporale raccomandata dalle norme canadesi sulla tubercolosi per la ripetizione di TST dopo l'esposizione (ad es. almeno 8 settimane dopo l'ultima esposizione) può essere utilizzata anche per l'IGRA.
- **ECDC** <sup>[44]</sup> → non si sostengono raccomandazioni specifiche, se non quelle di seguire le linee guida nazionali, data l'insufficienza di prove sul PPV degli IGRA. Tuttavia l'uso di IGRA con approccio in due fasi potrebbe aumentare la specificità del test, a seconda della popolazione testata (ad es. stato di vaccinazione BCG, frequente tra gli operatori sanitari). Si ritengono però necessarie ulteriori ricerche sul l'uso degli IGRA per lo screening degli operatori sanitari, ad esempio studi che valutano l'accuratezza dei test ripetuti del l'IGRA o che esplorano la questione della conversione/inversione

dei risultati dei test. Essendo i TST seriali, raccomandati da molte linee guida, motivo di incremento di falsi positivi, a causa di vaccinazioni BCG e frequente esposizione a NTM, le pratiche riguardanti l'uso di IGRA nello screening degli operatori sanitari variano a seconda degli obiettivi. Alcune linee guida propongono IGRA per lo screening degli operatori sanitari che sono stati eccezionalmente esposti alla tubercolosi o raccomandano lo screening prima di iniziare il lavoro. Tuttavia, diversi orientamenti non specificano se gli IGRA debbano essere uno strumento privilegiato per lo screening degli operatori sanitari. Possono comunque essere considerati come test di riferimento, tenendo conto dei problemi di test seriali di conversione/ inversione (in particolare intorno ai valori di cut-off per le prove).

- **USA – CDC** <sup>[24]</sup> → Un IGRA o un TST può essere utilizzato senza preferenza per lo screening periodico di persone che professionalmente esposte a *M. tuberculosis*, come gli operatori sanitari, con considerazioni speciali per quanto riguarda le conversioni e le inversioni. Per lo screening seriale e periodico, gli IGRA offrono vantaggi tecnici, logistici e possibili vantaggi economici rispetto al TST, ma hanno anche potenziali svantaggi. Per gli IGRA non sono necessari test in due fasi, perché questi non migliorano i risultati dei test successivi. Tra gli svantaggi risalta un maggiore rischio di conversione del test a causa di risultati falsi-positivi dell'IGRA con test di follow-up tra gli operatori sanitari a basso rischio, negativi allo screening preventivo. Il CDC ha pubblicato criteri per l'identificazione delle conversioni per TST e IGRA. La conversione TST è definita come un passaggio da negativo a positivo con un aumento di 10 mm nell'indurimento entro 2 anni, associato ad un aumento del rischio di tubercolosi attiva; mentre una conversione IGRA è definita come un cambiamento da negativo a positivo entro 2 anni senza alcuna considerazione dell'entità del cambiamento nella risposta TB. L'utilizzo di questo criterio potrebbe produrre un numero di conversioni superiore a quello osservato con i criteri più rigorosi applicati ai TST. Inoltre, non è stata dimostrata l'associazione tra una conversione di IGRA e il conseguente rischio di malattia. I criteri per interpretare i cambiamenti in un IGRA che identificano nuove infezioni rimangono incerti. In questo contesto il CDC incoraggia le istituzioni e i programmi in cui gli IGRA sono utilizzati a pubblicare le loro esperienze, in particolare per quanto riguarda i tassi di conversione, inversione e progressione verso la tubercolosi attiva nel tempo.

## 5 - MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato interamente condotto presso l'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord. Per raggiungere lo scopo prefissati dal progetto di test, è stato utilizzato il test QuantiFERON®-TB Gold Plus, test indiretto per la ricerca di INF-gamma, rilevato tramite chemiluminescenza (CLIA) grazie allo strumento LIAISON® XL. I risultati ottenuti sono stati elaborati attraverso un algoritmo interpretativo tramite un software dedicato. Tutti i campioni analizzati in merito al progetto di tesi, sono stati tutti accompagnati da un modulo con informazioni clinico-anamnestiche sul paziente (motivazione richiesta, immunodepressione, esito mantoux, precedenti anamnestici per vaccinazione con BCG).

### *5.1 - Modalità di prelievo e trattamento del campione*

Il test QuantiFERON®-TB Gold Plus utilizza due provette contenenti antigeni tubercolari, TB-1 e TB-2. Entrambe contengono gli antigeni peptidici associati al M. tuberculosis complex, ESAT-6 e CFP-10; la differenza consiste nella formulazione di tali antigeni: nella provetta TB-1 sono contenuti antigeni ESAT-6 e CFP-10 formulati in modo da stimolare la reattività dei linfociti T-helper CD4+, mentre la provetta TB-2 contiene gli antigeni formulati per indurre la risposta dei linfociti T-citotossici CD8+. Nel complesso, per il test, sono necessarie 4 provette dedicate, il cui contenuto è distinto dai colori del tappo:

- provetta tappo **GRIGIO** = controllo NIL (controllo negativo)
- provetta tappo **VERDE** = antigene TB1
- provetta tappo **GIALLO** = antigene TB2
- provetta tappo **VIOLA** = controllo MITOGENO (controllo positivo, agisce da stimolatore aspecifico dei linfociti T per verificare la loro reattività e per valutare la corretta incubazione del campione)



Figura 10 – Nell'immagine sono raffigurate le 4 provette necessarie per il prelievo per il test *QuantiFERON®-TB Gold Plus*

Le 4 provette QFT-Plus (*Nil, TB1, TB2, Mitogen*), vengono conservate, fino al momento del test, ad una temperatura di 4-25°C. Al momento del prelievo ematico tramite venipuntura, assicurarsi che la provetta si riempia fino a 1 ml per azione del vuoto (il segno nero indica l'intervallo valido 0,8–1,2 ml); il sangue potrebbe fluire con lentezza, quindi si consiglia di mantenere la provetta sull'ago per altri 2–3 secondi dopo che il flusso cessa. Se il livello del sangue non rientra nell'intervallo delimitato dal segno nero, è necessario prelevare un nuovo campione. Su ogni provetta apporre l'etichetta corrispondente ai dati del paziente, e quindi identificativa del campione, senza oscurare lo spazio libero così da poter visualizzare il corretto riempimento della provetta e la qualità del campione prelevato. Le provette riempite devono essere agitate per inversione 8-10 volte per assicurare che tutta superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue e gli antigeni si dissolvano sulle pareti. Non eseguire un'agitazione troppo energica, altrimenti si rischia di provocare una disgregazione del gel.

La stessa procedura viene applicata anche in caso di prelievo ematico mediante ago a farfalla. In questo caso è bene ricordare l'utilizzo, prima delle provette dedicate, di una provetta vuota per verificare che il tubicino si sia riempito di sangue.

Le provette vengono inviate dal centro prelievi al laboratorio, dove saranno incubate in posizione verticale a 37 °C per 16-24h nel rack dedicato, indicando sulle provette l'ora esatta dell'incubazione. Se non si mette il sangue ad incubare subito dopo il prelievo è

necessario miscelare le provette prima di incubarle. Trascorso il tempo d'incubazione, centrifugare le provette per 15 minuti ad una velocità compresa tra 2000 e 3000 g. Le provette dopo essere state centrifugate vengono disposte nell'apposito rack e poste in frigorifero. Il plasma nelle provette centrifugate si mantiene stabile per 28 giorni, se conservato a 2–8°C.

## **5.2 - Caratteristiche dello strumento Liaison XL**

LIAISON® XL è un sistema automatico che permette l'esecuzione di dosaggi immunometrici basati sul principio della chemiluminescenza (CLIA) che richiede l'utilizzo di particelle paramagnetiche (fase solida). L'automatizzazione fornita dallo strumento permette una riduzione della manualità degli operatori e di conseguenza, la riduzione degli errori manuali, ma garantisce anche un'elevata produttività, consentendo un caricamento continuo di campioni, reagenti e consumabili, un'elevata efficienza ed efficacia nel dosaggio. Lo strumento è dotato di un'area reagenti a temperatura controllata si inseriscono i reagenti necessari. Per ottimizzare le operazioni di carico è lo strumento stesso a guidare l'operatore: con la *luce spenta* è possibile estrarre il reagente, con la *luce lampeggiante* il canale è libero e vuoto, mentre con la *luce accesa* il reagente è in uso. È possibile caricare contemporaneamente fino a 25 Integrali e 4 flaconi di reagenti ausiliari in un'area dedicata. I reagenti Integrali sono gestiti tramite la funzione di "Quick Release" e vengono rilasciati non appena il sistema completa il processo richiesto. I reagenti starter sono disponibili in un'area dedicata e vengono continuamente monitorati per numero di lotto e quantità disponibile, con possibilità di caricamento in continuo. I reagenti sono pronti all'uso, per cui i componenti necessari al dosaggio sono integrati nella cartuccia, ad eccezione di quelli che richiedono reagenti ausiliari. Il sistema identifica i dati del kit controllando tutti i reagenti per: numero della cartuccia e del lotto, stabilità, livelli dei calibratori. In più è possibile l'aggiornamento dei dati relativi ai reagenti: stabilità a bordo e numero di test eseguibili tramite tecnologia Radio Frequency Identification (RFID). La componente dedicata ai materiali di consumo accoglie cuvette ottiche e puntali monouso, necessari a prevenire il carry-over e ottimizzare il ciclo produttivo. Entrambi sono caricabili in continuo: fino a 600 cuvette e 576 puntali. All'interno dello strumento vi è anche un'area dedicata alle taniche delle soluzioni di lavaggio e degli scarichi:

- Soluzione di scarico del sistema: comprende 2 taniche di raccolta liquidi con sensore di livello e una guida led per gestire il carico/scarico: led acceso se il liquido è in uso e led spento se la tanica è rimovibile
- Liquido di lavaggio puntale reagenti e aghi lavatore: una tanica connessa ad un'altra, più piccola, sul retro per carico/scarico in continuo
- Wash Buffer = liquido di lavaggio con caricamento in continuo grazie ad una tanica più piccola collegata nel retro

Il raccogliatore per lo scarico dei solidi contiene un sacco rosso con capacità di 1700-2000 pezzi, con la possibilità di scarico continuo grazie a un piccolo cassetto, offrendo un'autonomia operativa sino a 15 minuti.

Il caricamento dei campioni avviene in un'*area campioni* dedicata, che richiede l'utilizzo di un apposito rack da 12, inseribile in continuo negli alloggiamenti che accolgono fino a 10 rack, per un totale di 120 campioni caricabili simultaneamente. Sono posizionabili anche provette di diverse dimensioni, sempre rispettando la compatibilità col rack. Tutti i rack e i campioni inseriti vengono identificati con un codice a barre, con eventuale segnalazione in caso di problemi di riconoscimento. La funzione "Quick release" consente il rilascio da parte del sistema del rack campione, non appena espletate le fasi di dispensazione. Lo strumento rileva e monitora l'eventuale presenza di coaguli e/o volume di campione stesso, informando l'operatore con flag di errore. Il software del sistema è facile da utilizzare e consente di:

- ricevere/archiviare tutta la tracciabilità del lavoro svolto e da svolgersi
- ricevere informazioni sullo status di sistema e le relative quantità a bordo di consumabili e reagenti
- gestire l'intero piano di attività necessarie
- collegare lo strumento ad Host di laboratorio e la connessione in remoto

La massima resa analitica del sistema è pari a circa 180 determinazioni per ora, mantenuta nell'esecuzione della maggior parte dei dosaggi. Il primo risultato è disponibile in 17 minuti da tempo zero del sistema ("Ready"). Il procedimento di ricalibrazione a 2 punti su curva master memorizzata consente di allineare il sistema alla massima qualità disponibile attraverso un rapido e semplice processo. Le calibrazioni

sono stabili da 1 a 4 settimane. Alcuni dosaggi con espressione Qualitativa del risultato verranno ricalibrati con curve a 1 punto.

Tabella 5 – Riassunto delle caratteristiche dello strumento LIAISON® XL

<b>OVERVIEW</b>	
Descrizione sistema	Accesso casuale o sistema di immuno-analisi batch
Produttività	Sino a 180 test per ora
Tempo di primo risultato	17 minuti – dipende dall’analisi
Reagenti a bordo	25
<b>GESTIONE CAMPIONI</b>	
Rack campioni	Da 6 mm a 15 mm Ø interno & sino a 100mm d’altezza
Carico campioni	120 campioni, sino a 10 rack da 12 posizioni ciascuno, in caricamento continuo
Walk Away	Approssimativamente 6 ore
Gestione STAT	STAT possono essere assegnati in ogni posizione dell’area campioni
Matrici campione	Serum / Plasma / urine / CSF
Controllo integrità campioni	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensore pneumatico</li> <li>- Rilevazione e Flag per verifica volume ispersato/aspirato</li> <li>- Rilevazione clot</li> </ul>
Carryover campioni	Utilizzo di puntali monouso
<b>BARCODES</b>	
Provette campione	EAN / Code 128 / Code 39 / Coda-bar / Interleaved 2 o 5
Sieri di controllo	2D identificazione barcode e carico informazioni a software attraverso la lettura con scanner manuale
<b>GESTIONE REAGENTI</b>	
Temperatura magazzino reagenti	13°C ± 2
Monitoraggio reagenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Radio Frequency Identification (RFID)</li> <li>- Aggiornamento automatico del magazzino reagenti</li> <li>- Tracciabilità validità calibrazioni</li> <li>- Tracciabilità stabilità on-board</li> </ul>
Carico reagente	25 posizioni per Integral con caricamento in continuo + 4 posizioni per reagenti ausiliari
<b>CONSUMABILI</b>	
Cuvette	On board sino a 600 con caricamento continuo
Puntali campione	On board sino a 576
DI Water	10L tanica + 2L reservoir
Wash buffer	10L tanica + 2L reservoir
System cleaning solution	2L tanica
<b>SCARICHI</b>	
Scarichi solidi	2000 puntali campione e cuvette. Un secondo contenitore consente lo scarico continuo con autonomia sino a 15min
Scarichi liquidi	2x10 L taniche
<b>INTERFACCIA SOFTWARE</b>	
Sistema operativo	Microsoft® e Windows®
Monitor	17’’ diagonal LCD touch sensitive screen
GUI	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapido accesso a tutte le pagine</li> <li>- Eventi critici ed attività memorizzate</li> </ul>



	- Il software guida l'esecuzione e segnala la necessità di manutenzioni
<b>GESTIONE DEI RISULTATI</b>	
Visualizzazione	- Risultati sempre disponibili - Ricerca personalizzabile dall'utente - Possibilità di impostare regole di validazione prima della stampa o dell'invio a LIS
Retest	Retest sempre disponibile. Impostabili regole per retest automatico
Back-up dei dati	I risultati possono essere memorizzati manualmente o automaticamente
Privacy/Sicurezza	LIAISON®XL è in accordo con le regole per la privacy e sicurezza
<b>CONTROLLO DI QUALITÀ</b>	
Package	Monitoraggio di lungo termine comprensivo di grafici L-J e gestione delle regole di Westgard & Rili-BAK
Accesso	Accessibile in ogni momento
Definizione delle regole	Disponibile per l'utente
<b>CONDIZIONI OPERATIVE</b>	
Temperatura	15-32°C
Umidità	10%-85% RH non condensing
Elettrica	100-240 V, 50-60Hz
Dimensioni (esclusi monitor e accessori)	Altezza: 150 cm; Larghezza: 150 cm; Profondità: 90 cm
Peso	LIAISON®XL 300 kg (compresi monitor e accessori)
Rumorosità	63.9 dBA alla normale postazione di lavoro

### **5.3 - Caratteristiche del test QuantiFERON®-TB Gold Plus**

Il test DiaSorin LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus è un test indiretto utilizzato per la determinazione dell'IFN-gamma secreto da linfociti T sensibilizzati verso antigeni di *M. tuberculosis*. È un test sandwich diretto che sfrutta, per la rilevazione dell'analita, la chemiluminescenza (CLIA). Si utilizzano anticorpi monoclonali, di topo, anti-IFN-gamma per rivestire le particelle magnetiche (fase solida) e altri anticorpi monoclonali anti-IFN-gamma legati a un derivato dell'isoluminolo (coniugato isoluminolo-anticorpo): il legame tra anticorpi monoclonali e isoluminolo nel coniugato è mediato da un immunocomplesso biotina-streptavidina. Durante la prima incubazione, l'IFN-gamma presente nei calibratori, nei controlli e, eventualmente, nei campioni si lega alle particelle magnetiche sulla superficie delle quali sono immobilizzati anticorpi monoclonali anti-IFN-gamma umano. Segue una serie di lavaggi per eliminare dal pozzetto di reazione tutto ciò che non si è legato e che non è quindi indicativo della reazione. Si aggiunge il coniugato, che andrà a legarsi all'IFN-gamma, a livello di un differente sito di legame,

formando un sandwich. Durante questa seconda incubazione, viene aggiunto il tampone per dosaggio W, per ridurre i legami non specifici correlati al campione. Al termine dell'incubazione, il materiale non legato viene rimosso mediante un secondo ciclo di lavaggio. In seguito vengono aggiunti i reattivi starter che inducono una reazione di chemiluminescenza con andamento di tipo "flash". Il segnale luminoso, e quindi la quantità di coniugato anticorpo-isoluminolo, viene misurato da un fotomoltiplicatore in unità relative di luce (RLU, relative light units) ed è indicativo della concentrazione di IFN-gamma presente nei calibratori, nei campioni o nei controlli. Materiali forniti:

- Integrali di reattivi:
  - Particelle paramagnetiche (2,5 ml) rivestite con anticorpo monoclonale di tipo anti-IFN-gamma umano, sieroalbumina bovina, tampone fosfato e < 0,1% sodio azide
  - Diluente (18 ml) contenente sieroalbumina bovina, caseina, tampone fosfato EDTA, 0,2% ProClin® 300, IgG non specifiche (policlonale di topo), gentamicina solfato 0,1 g/L
  - Tampone per il dosaggio W con sieroalbumina bovina, caseina, tampone fosfato, EDTA, 0,2% ProClin® 300 e un colorante blu inerte
- Inclusi nel kit:
  - Calibratore A liofilizzato costituito da IFN-gamma umano ricombinante (prodotto in E. coli), tampone HEPE, sieroalbumina bovina, siero bovino, 0,4% ProClin® 300, 0,2 g/L gentamicina solfato, detergenti
  - Calibratore B liofilizzato con medesima composizione del calibratore A
  - Tampone R con streptoavidina coniugata con derivato dell'isoluminolo, sieroalbumina bovina, caseina, tampone fosfato, 0,2% ProClin® 300, gentamicina solfato 0,1 g/L, IgG non specifiche e detergenti
  - Coniugato liofilizzato: anticorpo monoclonale biotinilato anti-IFN-gamma umano, tampone HEPES, sieroalbumina bovina, caseina, IgG non specifiche, 0,2% ProClin® 300, gentamicina solfato 0,1 g/L e detergenti

Il tampone R, il diluente, il tampone per dosaggio W e le particelle magnetiche sono già pronte all'uso, mentre i calibratori A e B, e i coniugati sono liofilizzati, quest'ultimi da ricostituire con tampone R. Per mantenere l'integrità di ogni reagente è importante una corretta conservazione; verificare le condizioni idonee sulla scheda del kit.

Per la valutazione del controllo di qualità, i controlli LIAISON® devono essere analizzati in singolo per valutare le prestazioni del test. I valori dei controlli devono essere compresi entro i limiti attesi: ogni volta che uno, o entrambi, sono al di fuori dell'intervallo predefinito, la taratura dello strumento deve essere ripetuta e i controlli rianalizzati.

I risultati del test LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus sono interpretati utilizzando i seguenti criteri. I risultati del campione sono riportati in unità internazionali per mL (IU/mL). Sebbene il test rilevi quantitativamente l'IFN-gamma, l'interpretazione del risultato per un singolo paziente è strettamente qualitativa. L'entità del livello di IFN-gamma misurato non può essere correlata allo stadio o al grado di infezione, al livello di risposta immunitaria o alla probabilità di progressione verso una malattia attiva. Le risposte al controllo positivo Mitogen, e occasionalmente alle provette TB1 e TB2, possono essere al di sopra dell'intervallo del dosaggio. Non diluire i campioni al di sopra dell'intervallo. Si potrebbero riscontrare casi di risposta non rilevabile. Ciò non influisce sui risultati del test. Ai fini del calcolo:

I valori IFN-gamma > 10 IU/mL devono essere trattati come 10 IU/mL

I valori IFN-gamma < 0 IU/mL devono essere trattati come 0 IU/MI

Tabella 6 – Schema per l'interpretazione dei risultati del test LIAISON® XL QuantiFERON®-TB Gold Plus

Nil (UI/mL)	TB1 meno Nil (UI/mL)	TB2 meno Nil (UI/mL)	Mitogen meno Nil (UI/mL)	Risultato di Liaison® QuantiFERON®-TB Gold Plus	Report/ Interpretazione
≤ 8,0	≥ 0,35 e ≥25% di Nil	Qualsiasi	Qualsiasi	Positivo	Probabile infezione da M. tuberculosis
	Qualsiasi	≥ 0,35 e ≥25% di Nil			
	< 0,35 oppure ≥ 0,35 e ≥25% di Nil	< 0,35 oppure ≥ 0,35 e ≥25% di Nil	≥ 0,5	Negativo	NON probabile infezione da M. tuberculosis
	< 0,35 oppure ≥ 0,35 e ≥25% di Nil	< 0,35 oppure ≥ 0,35 e ≥25% di Nil	< 0,5	Indeterminato	Impossibile determinare la probabilità di infezione da M. tuberculosis
>8,0	Qualsiasi				

Questi calcoli vengono eseguiti dal LIAISON® QuantiFERON® Software (LQS), che facilita la gestione delle provette QIAGEN QuantiFERON®-TB Gold Plus Blood Collection Tubes (provette per prelievo ematico) e l'interpretazione dei risultati del test LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus.

#### ***5.4 – Modulo raccolta dati clinico-anamnestici***

Tutti i prelievi per l'esecuzione del test Quantiferon sono accompagnati da un modulo che riporta i dati clinico-anamnestici indispensabili per l'interpretazione del test, in particolare viene chiesto di indicare le possibili cause di immunodepressione del paziente, l'esito della reazione di Mantoux se eseguita recentemente ed eventuali precedenti anamnestici di vaccinazione con BCG (anno).

#### ***5.5 – Elaborazione dati e analisi statistica***

I dati sono stati elaborati utilizzando il foglio di calcolo Excel.

## 6. RISULTATI

Nel periodo settembre 2017-settembre 2020 sono pervenute al Laboratorio Analisi dell'Ospedale Santa Croce (Fano, PU) dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord (AORMN) 666 richieste di quantiferon dalle Unità Operative (UUOO) dell'AORMN e dal territorio (MMG e AV1) con informazioni clinico-anamnestiche rilevanti nel 73% dei casi e parziali solo per pazienti esterni.

Queste informazioni sono state raccolte distribuendo un modulo da compilare in concomitanza all'esecuzione del prelievo sia ai reparti ospedalieri che alle segreterie dei punti prelievo esterni al fine di ottenere informazioni clinico-anamnestiche utili all'interpretazione del dato di laboratorio.

L'84,4% dei campioni analizzati appartiene a pazienti/utenti afferenti l'AORMN (52,7% esterni, 47,3% interni) ed il 15,6% all'AV1 (73,1% esterni, 26,9% interni).

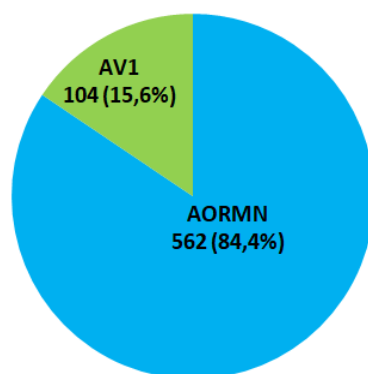


Figura 11 – Numero di richieste di Quantiferon per AORMN e AV1

In particolare il 47,3% dei pazienti delle UUOO dell'AORMN risulta appartenere alle seguenti UUOO: gastroenterologia (18,7%), malattie infettive (8,2%), medicina interna (4,4%), neurologia (2,5%), dialisi (2,1%), cardiologia (2,0%), medicina d'urgenza (2,0%), pneumologia (2,0%) e per il 5,5% al altri reparti (pediatria 1,6%, direzione sanitaria 1,4%, ematologia 1,1%, nefrologia 0,4%, UTIC 0,4%, chirurgia 0,2%, intensità di cura 0,2%, oncologia 0,2%, rianimazione 0,2%).

Mentre il 26,9% delle richieste pervenute dall'AV1 è distribuito tra le UUOO degli ospedali di Urbino (25%) e Pergola (75%).

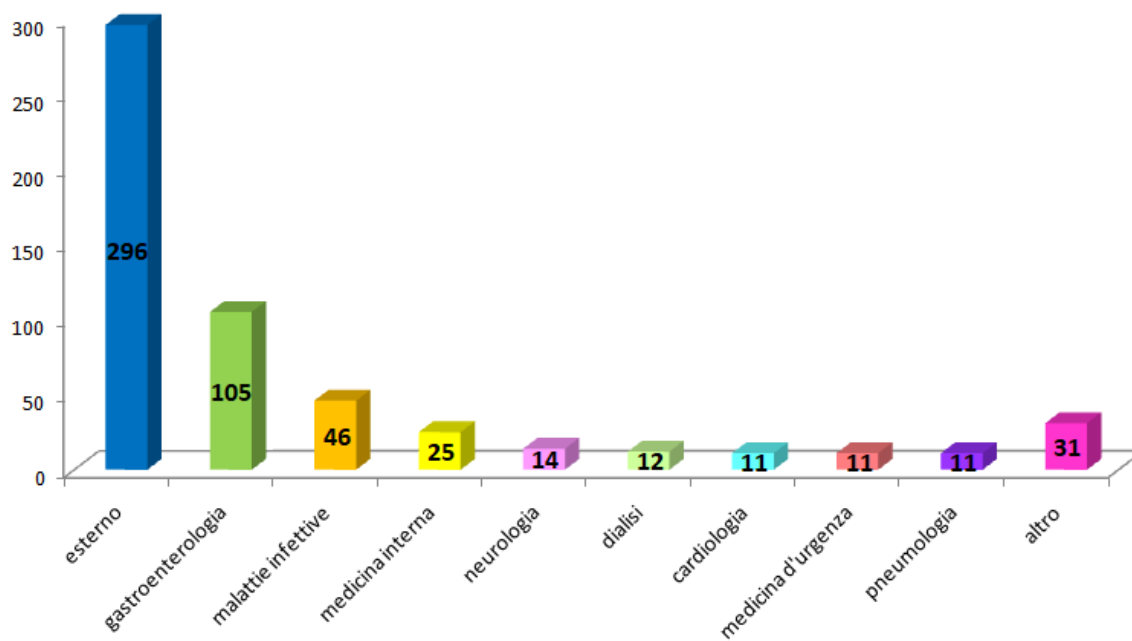


Figura 12 – Distribuzione del numero di richieste di Quantiferon dei pazienti/utenti afferenti all'AORMN

La popolazione analizzata è equamente distribuita tra i sessi (52,4% maschi, 47,6% femmine) ed ha un'età media di 51,1 anni per la popolazione maschile (min 0 aa, max 91 aa) e del 47,9 anni per quella femminile (min 2 aa, max 90 aa).

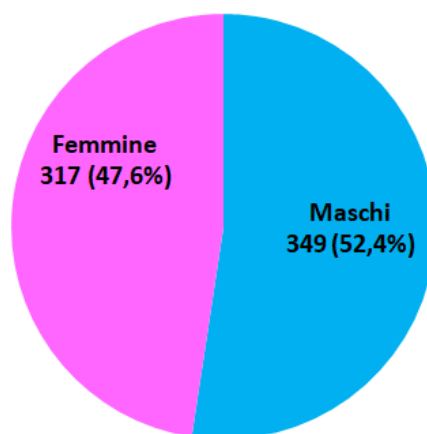


Figura 13 – Distribuzione della popolazione per sesso

Relativamente all'età questa segue una distribuzione gaussiana e le richieste maggiori riguardano le fasce di età comprese tra i 21-40 anni (25,4%), 41-60 anni (38,9%) e 61-80 anni (26,4%).

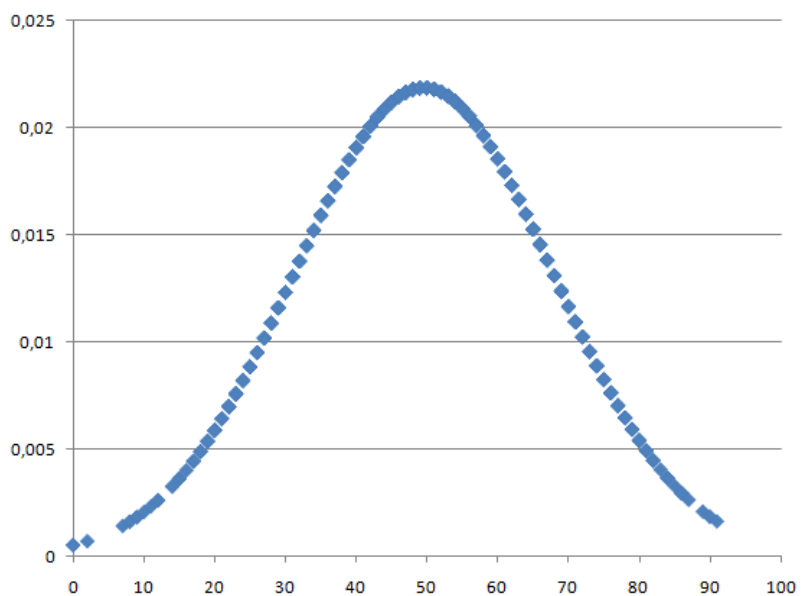


Figura 14 – Distribuzione gaussiana dell'età della popolazione

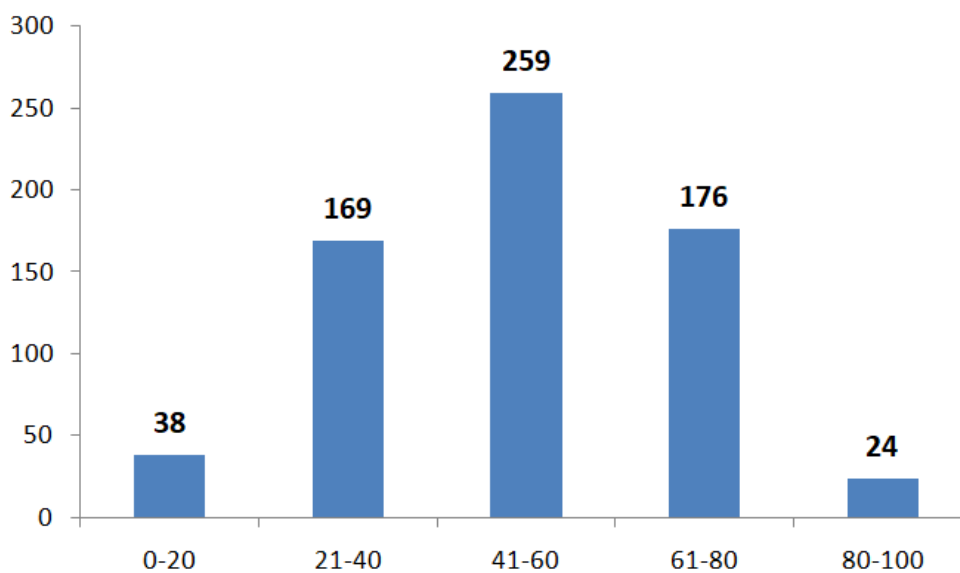


Figura 15 – Distribuzione della popolazione per fasce d'età

Sono risultati positivi, negativi e indeterminati al test QuantiFERON®-TB Gold Plus rispettivamente il 18,2% (121), il 79,7% (531) e il 2,1% (14) dei campioni analizzati.

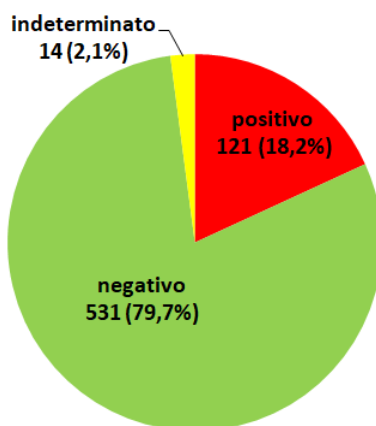


Figura 16 – Esito del test QuantiFERON®-TB Gold Plus

Nel 27,7% dei pazienti era noto anche il risultato della Mantoux espresso in mm per cui è stato possibile valutare concordanza (58,8%), VPN (90,9%), VPP (65,9%), sensibilità (93,5%), specificità (90,0%) del test.

Dall'analisi eseguita sono risultati discordanti gli esiti di reazione di Mantoux e quantiferon di 33 pazienti.

In particolare:

- 2 pazienti risultavano avere un test di Mantoux negativo e un quantiferon positivo; di questi uno era in trattamento retro virale per HIV e l'altro era affetto da una patologia dermatologica (scabbia);
- 31 pazienti risultavano avere un test di Mantoux positivo (mm > 10) e un quantiferon negativo; si tratta di pazienti con meningite tubercolare pregressa, soggetti in terapia immunosoppressiva, pazienti oncologici e dipendenti che operano in reparti a rischio (pneumologia, malattie infettive).

Il 18,2% dei soggetti positivi al test era in terapia con farmaci biologici.



Analizzando la distribuzione dei valori di Interferon-gamma nella popolazione analizzata emerge che il 73,9% dei valori cade nell'intervallo numerico <0,2 UI/ml, mentre il 10,8% degli esiti numerici cade nella zona grigia che delimita la positività o negatività al test. In particolare il 5,8% dei valori cade nell'intervallo 0,21-0,34 UI/ml, mentre il 5,8% dei valori cade nell'intervallo 0,35-0,7 UI/ml.

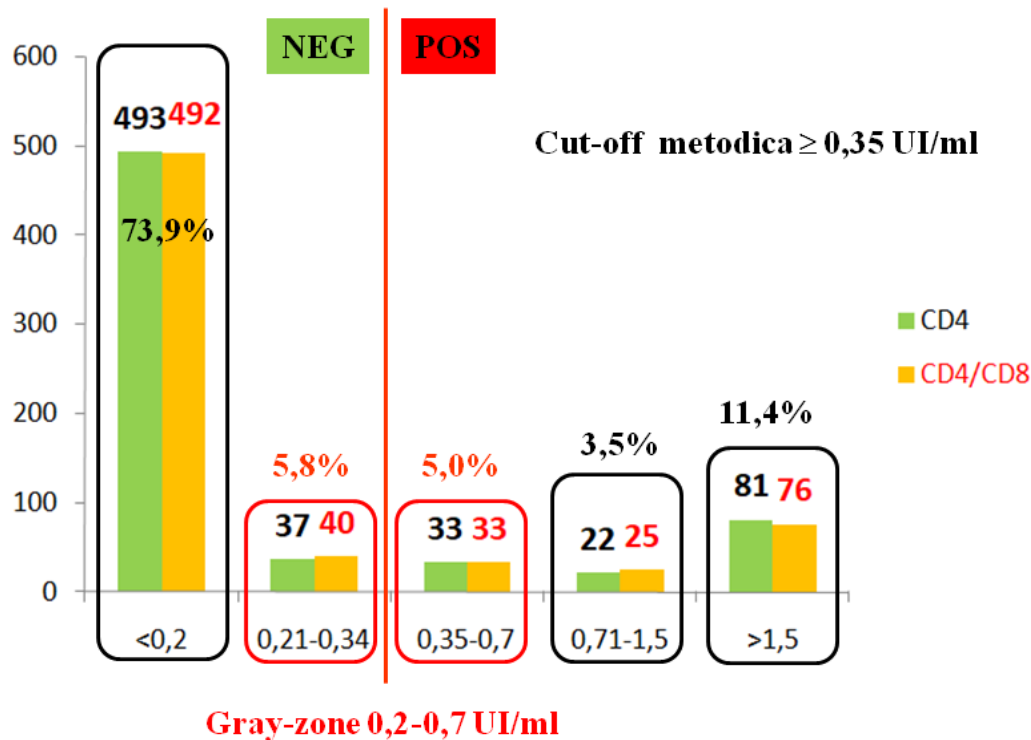


Figura 17 – Distribuzione dei valori di Interferon gamma

## 7. DISCUSSIONE

L'introduzione del test quantiferon nella diagnostica di laboratorio dell'AORMN è stata preceduta da un approccio multidisciplinare con l'obiettivo di rendere il test disponibile all'interno di percorsi diagnostici appropriati (es. PDTA MICI) come reflex test o come test complementare alla mantoux in una popolazione selezionata di pazienti, confermando la necessità da parte del Microbiologo Clinico di intervenire e presidiare l'appropriatezza della richiesta.

Allo scopo di avere richieste appropriate rispetto al quesito clinico è stato introdotto un modulo cartaceo per la rilevazione delle informazioni clinico-anamnestiche del paziente, utile per l'interpretazione del dato di laboratorio, ma soprattutto per limitare l'abuso del test e renderlo disponibile a quelle categorie di pazienti per i quali è necessario intraprendere un percorso terapeutico particolare anche alla luce dell'impiego dei farmaci biologici nel trattamento delle MICI.

Dall'analisi dei dati emerge la corretta appropriatezza prescrittiva (666 richieste/36 mesi) e l'utilità del test non solo per la diagnosi di infezione tubercolare latente, ma soprattutto per la diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis* in pazienti malati congiuntamente ad altri strumenti di indagine, quali il test di Mantoux, la valutazione del rischio, le indagini radiologiche e altre indagini medico-diagnostiche.

La casistica riportata evidenzia che la popolazione analizzata è una popolazione a bassa prevalenza per l'infezione latente da *M. tuberculosis*.

L'analisi statistica indica un valore predittivo positivo del test del 65,9%, contro un valore predittivo negativo del 90,9% quando utilizzato in associazione al test di Mantoux. Un'attenzione particolare deve essere riposta nell'analisi dei valori numerici che cadono nell'intorno del cut-off di positività del test (zona grigia), in quanto i dati analizzati hanno suggerito al microbiologo di mettere una nota a completamento del referto allo scopo di consigliare il monitoraggio nel tempo dei valori numerici per riconoscere tempestivamente una falsa negatività al test.

## 8. CONCLUSIONI

L'introduzione del test quantiferon nella diagnostica di laboratorio preceduto da un approccio multidisciplinare ha raggiunto l'obiettivo di renderlo disponibile all'interno di percorsi diagnostici appropriati (es. PDTA MICI) come reflex o come test complementare alla Mantoux in categorie di soggetti selezionati, attraverso una richiesta appropriata che sottolinea l'importanza dell'interazione tra diverse figure professionali (microbiologo, clinico, MMG, PdLS, specialisti).

Dall'analisi dei dati emerge la corretta appropriatezza prescrittiva e l'utilità del test non solo per la diagnosi di infezione tubercolare latente, ma soprattutto per la diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis* in pazienti malati congiuntamente ad altri strumenti quali l'esito della Mantoux, la valutazione del rischio, le radiografie e altre indagini medico-diagnostiche.

Relativamente alle linee guida nazionali e internazionali sull'uso dei test IGRA si possono fare le seguenti osservazioni al fine di migliorare ulteriormente l'appropriatezza prescrittiva del test quantiferon:

- ✓ nei bambini con età inferiore ai 5 anni eseguire il test di Mantoux in associazione al quantiferon per aumentare la sensibilità del test,
- ✓ utilizzare i test IGRA nelle seguenti categorie di soggetti:
  - persone ad alto rischio di non presentarsi alla seconda visita per la lettura (tossicodipendenti, senza tetto, ecc),
  - persone vaccinate con BCG,
  - nei follow-up per evitare l'effetto booster
- ✓ possono essere utilizzati indifferentemente per:
  - contatti recenti con persone con Tb attiva o sospetta TB attiva (Mantoux rischio effetto booster; IGRA tempi di conversione pochi dati),
  - screening occupazionali per persone a rischio (problema conversioni/reversioni).

Un'attenzione particolare deve essere riposta nell'analisi dei valori numerici che cadono nell'intorno del cut-off di positività del test (zona grigia), in quanto i dati analizzati hanno suggerito al microbiologo di mettere una nota a completamento del referto allo scopo di consigliare il monitoraggio nel tempo dei valori numerici per riconoscere tempestivamente una falsa negatività al test.

I test IGRA misurano una risposta immunitaria dell'ospite verso antigeni specifici, non sono diagnostici in senso assoluto ma si rilevano estremamente utili in determinate situazioni cliniche e presentano molti vantaggi e alcuni limiti rispetto alla Mantoux.

In particolare permettono con un unico prelievo, che non comporta per il paziente il disagio di recarsi di nuovo in laboratorio per la lettura del test come accade per la reazione di Mantoux, di distinguere tra infezione e vaccinazione e di garantire un maggiore specificità per *M. tuberculosis* complex rispetto ai MOTT.

Hanno il limite di non permettere la distinzione tra infezione e malattia, e di essere poco sensibili e specifici se applicati ai bambini di età inferiore ai 5 anni.

## **10. BIBLIOGRAFIA**

- 1 - World Health Organization. (s.d.). *Global Tuberculosis Control, Report 2019*.
- 2 - World Health Organization. (s.d.). The End TB Strategy, Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015.
- 3 - La Placa Michele. (2015). *Principi di microbiologia medica*.
- 4 - Dylan Tierney MD, MPH, Edward A. Nardell MD, Harvard Medical School. (s.d.). *MANUALE MSD*. Tratto da <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/micobatteri/tubercolosi>
- 5 - World Health Organization. (2019). Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe.
- 6 - M. Ramirez-Lapausa, A. Menendez-Saldana, A. Noguerado-Asensio. (2005). Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *AFP journal*.
- 7 - Pooja Singh, Surya Kant, Priyanka Gaur, Abhilasha Tripathi, Sarika Pandey. (gennaio, 2018). Extra Pulmonary Tuberculosis: An Overview and Review of Literature . *Internation Journal of Life-Sciences Scientific Researche*.
- 8 - Shah Ashok, Kunal, Shekhar. (2019). Miliary Tuberculosis. In *Tuberculosis: Selected problems*.
- 9 - World Health Organization, Definitions and reporting framework for tuberculosis - 2013 revision, updated December 2014 and January 2020
- 10 - Luo, M., Wang, W., Zeng, Q., Luo, Y., Yang, H., & Yang, X. (2018). Tuberculous meningitis diagnosis and treatment in adults: A series of 189 suspected cases. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(3), 2770–2776
- 11 – World Health Organization, 2018, Guidelines on the management of latent tuberculosis infection

12 - Kiazzyk, S., & Ball, T. B. (2017). Latent tuberculosis infection: An overview. Canada communicable disease report = Releve des maladies transmissibles au Canada, 43(3-4), 62–66. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v43i34a01>

13 - Giuseppe Miragliotta, Giuseppina Barra Parisi, Antonio De Santis, Emanuele Vinci. (s.d.). La Tuberculosis polmonare: diagnostica di laboratorio. Medical System S.P.A. - Genova.

14 - Servizio Ospedaliero Provinciale – Ospedale di Trento - U.O. Microbiologia e Virologia. (s.d.). Protocollo diagnostico: percorso diagnostico della tubercolosi attiva Tratto da <http://www.newmicro.it>

15 - European Centers of Disease Prevention and Control (2018). Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union. Tratto da <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/>

16 - Gruppo di Lavoro Micobatteri (GLaMic) - Enrico Tortoli, Anna Camaggi, Daniela Cirillo, Danila Costa, Lanfranco Fattorini, Eliana Frizzera, Daniela Marchetti, Monica Pecorari, Federica Piana, Claudio Piersimoni, Claudio Scarparo. (s.d.). Percorso Diagnostico Della Tuberculosis. Tratto da AMCLI: <http://www.amcli.it/>

17 - Ministero della Salute (2001) Manuale tecnico per la diagnosi microbiologica della tubercolosi. Tratto da <http://www.salute.gov.it>

18 - Tiwari RP, Hattikudur NS, Bharmal RN, Kartikeyan S, Deshmukh NM, Bisen PS. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. Tuberculosis (Edinb). 2007 May;87(3):193-201. doi: 10.1016/j.tube.2006.07.005. Epub 2006 Oct 6. PMID: 17029964.

19 - Sang-Nae Cho, Patrick J. Brennan. (2007). Tuberculosis: Diagnostics.

20 - Jim F. Huggett, Timothy D. McHughb, Alimuddin Zumla. (2003). Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.

21 – Nurwidya, F., Handayani, D., Burhan, E., & Yunus, F. (2018). Molecular Diagnosis of Tuberculosis. *Chonnam medical journal*, 54(1), 1–9. <https://doi.org/10.4068/cmj.2018.54.1.1>

22 - Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK, Prasad GB, Chandra R, Fraziano M, Colizzi V, Bisen PS. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities. *J Clin Lab Anal*. 2003;17(5):155-63. doi: 10.1002/jcla.10086. PMID: 12938143; PMCID: PMC6807935.

23 - Centers for Disease Control and Prevention. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect Mycobacterium tuberculosis Infection, United States. *MMWR* 2010; 59 (No.RR-5)

24 - Pedro Eduardo Almeida Da Silva, Juan Carlos Palomino, Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 66, Issue 7, July 2011, Pages 1417–1430, <https://doi.org/10.1093/jac/dkr173>

25 - Center for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health Human Services. (Novembre, 2013). Mantoux tuberculin skin test: Facilitator Guide

26 - Public Health Agency of Canada. (7th Edition, 2014). Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection. In *Canadian Tuberculosis Standards*.

27 - Centers for Disease Control and Prevention. (Sixth Edition, 2013). Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know

28 - Berkel GM, Cobelens FG, de Vries G, Draayer-Jansen IW, Borgdorff MW. Tuberculin skin test: estimation of positive and negative predictive values from routine data. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005 Mar;9(3):310-6. PMID: 15786896.

29 - CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (s.d.). TB Elimination: Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) - Blood Tests for TB Infection. Tratto da <https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/testing/IGRA.pdf>

30 - Pai, M., Denkinger, C. M., Kik, S. V., Rangaka, M. X., Zwerling, A., Oxlade, O., Metcalfe, J. Z., Cattamanchi, A., Dowdy, D. W., Dheda, K., & Banaei, N. (2014). Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical microbiology reviews*, 27(1), 3–20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-13>

31 - Cattamanchi, A., Smith, R., Steingart, K. R., Metcalfe, J. Z., Date, A., Coleman, C., Marston, B. J., Huang, L., Hopewell, P. C., & Pai, M. (2011). Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*, 56(3), 230–238. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31820b07ab>

32 - Slater M, Parsonnet J, Banaei N. Investigation of false-positive results given by the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay. *J Clin Microbiol.* 2012 Sep;50(9):3105-7. doi: 10.1128/JCM.00730-12. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22785197; PMCID: PMC3421800.

33 - Doberne D, Gaur RL, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. *J Clin Microbiol.* 2011 Aug;49(8):3061-4. doi: 10.1128/JCM.01136-11. Epub 2011 Jun 22. PMID: 21697332; PMCID: PMC3147723.

34 - Gaur RL, Pai M, Banaei N. Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay. *J Clin Microbiol.* 2013 Nov;51(11):3521-6. doi: 10.1128/JCM.01627-13. Epub 2013 Aug 21. PMID: 23966505; PMCID: PMC3889728.



35 - van Zyl-Smit RN, Pai M, Peprah K, Meldau R, Kieck J, Juritz J, Badri M, Zumla A, Sechi LA, Bateman ED, Dheda K. Within-subject variability and boosting of T-cell interferon-gamma responses after tuberculin skin testing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Jul 1;180(1):49-58. doi: 10.1164/rccm.200811-1704OC. Epub 2009 Apr 2. PMID: 19342414.

36 - Gaur, R. L., Suhosk, M. M., & Banaei, N. (2012). In vitro immunomodulation of a whole blood IFN- $\gamma$  release assay enhances T cell responses in subjects with latent tuberculosis infection. *PloS one*, 7(10), e48027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048027>

37 – Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa-Kambafwile J, Fielding K, Wilkinson RJ, Pai M. Predictive value of interferon- $\gamma$  release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012 Jan;12(1):45-55. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70210-9. Epub 2011 Aug 16. PMID: 21846592; PMCID: PMC3568693.

38 - Pai, M., Zwerling, A., & Menzies, D. (2008). Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Annals of internal medicine*, 149(3), 177–184. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00241>

39 - Pai, M., & Elwood, K. (2012). Interferon-gamma release assays for screening of health care workers in low tuberculosis incidence settings: dynamic patterns and interpretational challenges. *Canadian respiratory journal*, 19(2), 81–83. <https://doi.org/10.1155/2012/420392>

40 - Istituto Nazionale Malattie Infettive, Ospedale L. Spallanzani – ROMA - ed il Gruppo di Lavoro Micobatteri AMCLI. (2011, novembre). Diagnosi immunologica della malattia e dell'infezione tubercolare: stato dell'arte e nuove prospettive. Tratto da Amcli: [http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/LTB\\_GLAMIC\\_20120705.pdf](http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/LTB_GLAMIC_20120705.pdf)

41 – Gouzhong Zhou, PhD, Qingyi Luo, PhD, Shiqi Luo, BS, Zhaowei Teng, PhD, Zhenhua Ji, MS, Jiaru Yang, MS, et al. (2020). Interferon- $\gamma$  release assays or tuberculin skin test for detection and management of latent tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet, Infectious Diseases*.

DOI:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30276-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30276-0)

42 – Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon- $\gamma$  release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jun;17(6):806-14. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03555.x. PMID: 21682801

43 – Canadian Tuberculosis Committee. Interferon gamma release assays for latent tuberculosis infection. An Advisory Committee Statement (ACS). *Can Commun Dis Rep (Releve des maladies transmissibles au Canada)* 2010; 36 (ASC-5): 1–21).

44 – European Centers of Disease Prevention and Control (2011). Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. Tratto da <https://www.ecdc.europa.eu/en>

45 – ECDC, Public health guidance on screening and vaccination for infectious diseases in newly arrived migrants within the EU/EEA

46 – Guidelines for Screening for Tuberculosis Infection and Disease during the Domestic Medical Examination for Newly Arrived Refugees U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases Division of Global Migration and Quarantine

47 – Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord, U.O.C. laboratorio patologia clinica

istruzione operativa esecuzione prelievo per QuantiFERON

48 – DiaSorin, The Diagnostic Specialist. Scheda tecnica apparecchiatura LIAISON<sup>®</sup> XL, n. documento; APP.ST.34, revisione:3, approvato il 21/03/13. RDM: ITSA-RFC-000271

49 – DiaSorin, The Diagnostic Specialist. Scheda tecnica LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus ([REF] 311010), IT - 200/007-001, 02 - 2018-11