

### *Protocollo diagnostico*

## **PERCORSO DIAGNOSTICO DELLA TUBERCOLOSI ATTIVA**

*Dott.ssa Iole Caola - U.O. Microbiologia e Virologia*

*Dott. Claudio Paternoster - U.O. Malattie Infettive*

*Dott. Fabio Boccafoglio – U.O. Pneumologia*

*Dott. Dino Sella – U.O. Pneumologia*

*Dott. Paolo Lanzafame - U.O. Microbiologia e Virologia*

La definizione e promozione di percorsi diagnostici in grado di assicurare una diagnosi di laboratorio tempestiva e corretta riveste un ruolo fondamentale per il controllo della tubercolosi. Tale diagnosi viene posta dai laboratori di micobatteriologia clinica che svolgono quindi un ruolo centrale nella lotta alla malattia. Il loro contributo consiste essenzialmente nella ricerca e nell'isolamento dei micobatteri, nella loro identificazione a livello di specie, nonché nella determinazione della sensibilità del ceppo isolato ai chemioterapici.

Poiché la diagnosi microbiologica di tubercolosi richiede in genere metodi e reagenti specifici di uso non routinario, nonché più tempo e maggiori requisiti di biosicurezza rispetto alla comune diagnostica batteriologica, soltanto i laboratori di microbiologia clinica con sufficiente volume di esami microbiologici possono mantenere nel tempo un'adeguata competenza nella diagnosi micobatteriologica. Nella PAT i laboratori di Microbiologia e Virologia di Trento ed il Laboratorio di Patologia Clinica di Rovereto effettuano ricerca microscopica e colturale di micobatteri; la ricerca rapida e l'identificazione con metodi di biologia molecolare ed il saggio di sensibilità ai farmaci antitubercolari vengono eseguiti solamente a Trento.

La ricerca può essere effettuata su qualsiasi tipo di materiale biologico e permette, in caso di reperimento di specie appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex, di fare diagnosi di tubercolosi.

### **Eziologia della TB**

I micobatteri sono bacilli dotati di alcol-acido resistenza (caratteristica che li rende riconoscibili all'osservazione microscopica) e caratterizzati da un ritmo riproduttivo assai più lento di quello degli altri microorganismi.

Le specie attualmente conosciute sono circa 130, fra di esse sono invariabilmente patogeni i micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), agenti causali dell'infezione tubercolare.

*M. tuberculosis* complex è un raggruppamento che include alcune specie molto affini fra di loro, le principali sono *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium africanum*

Il Bacillo di Calmette Guérin (BCG), ceppo attenuato di *M. bovis* usato per la vaccinazione antitubercolare e per la immunoterapia del cancro vescicale, può occasionalmente essere isolato da suppurazione in sede vaccinale o dalle urine di soggetti sottoposti ad immunoterapia antitumorale: in questi casi l'isolamento non ha significato clinico. Diverso è il

caso dei soggetti immunodepressi nei quali esso può essere responsabile di patologie, anche disseminate.

Al genere "*Mycobacterium*" appartengono molte altre specie di micobatteri denominate "micobatteri non tubercolari (NTM)" o "micobatteri atipici", non appartenenti al gruppo MTC, dal quale devono essere necessariamente distinte per il diverso significato clinico ed epidemiologico che rivestono.

### **L'infezione da M. tuberculosis**

Il MTB si trasmette quasi esclusivamente per contagio interumano, per via aerea, attraverso goccioline di saliva (droplet nuclei) eliminate nell'ambiente, soprattutto con la tosse, dall'individuo affetto da tubercolosi bacillifera polmonare, bronchiale, tracheale o laringea. I bacilli, che restano lungamente in sospensione dopo l'essiccamento delle goccioline, possono essere inalati da soggetti sani. Aerosol contenenti bacilli si possono generare anche durante il trasporto e la manipolazione di materiale infetto.

Altre forme di trasmissione sono rare e rivestono scarsa importanza epidemiologica.

Nel soggetto infettato si possono verificare due situazioni:

A. la malattia tubercolare, generata dal prevalere dei fattori aggressivi, cioè la carica microbica e la sua virulenza, su quelli difensivi rappresentati dal sistema immunitario dell'ospite. Dati epidemiologici indicano che circa il 10% dei soggetti infettati sviluppa una tubercolosi, metà entro due anni dall'infezione e metà in un momento successivo della vita.

B. l'infezione tubercolare latente, condizione che risulta dalla capacità del sistema immunitario dell'ospite di opporsi all'evolversi dell'infezione in malattia. Questa condizione può durare per tutta la vita, ma l'equilibrio può rompersi per il verificarsi di stati di deficienza immunitaria, anche transitoria.

### **La malattia tubercolare: Il sospetto clinico**

La tubercolosi può interessare tutti gli organi e tessuti dell'organismo e si esprime in maniera polimorfa, dal silenzio clinico delle fasi iniziali ad una notevole varietà di sintomi a seconda della sede e del numero delle localizzazioni e della gravità della forma.

La forma più importante è quella polmonare, sia perché è la più frequente, sia perché è l'unica coinvolta nella diffusione della malattia (eliminazione dei bacilli con i colpi di tosse, all'interno delle goccioline di saliva).

I sintomi della tubercolosi, in particolare di quella polmonare, sono noti da tempo, ma la loro scarsa specificità fa sì che il sospetto diagnostico sia spesso trascurato in ambiti geografici o temporali caratterizzati da incidenza bassa.

Sintomi di sospetto della malattia, indipendentemente dalla localizzazione, ma in genere più accentuati nelle forme polmonari e disseminate, sono: febbre, soprattutto serotina, sudorazione notturna, calo ponderale, astenia, inappetenza.

Il sintomo più comune di tubercolosi polmonare è la tosse produttiva e persistente.

Sebbene la persistenza della tosse non rivesta carattere di specificità, nei paesi ad alta e moderata prevalenza una tosse che duri più di 2-3 settimane è stata assunta dalla maggioranza delle LG come criterio di sospetta tubercolosi. Nei paesi a bassa prevalenza è più verosimile che la tosse persistente sia attribuibile ad altre condizioni patologiche, tuttavia il sospetto di tubercolosi non va trascurato, soprattutto in presenza di fattori di rischio.

Altri sintomi di tubercolosi polmonare sono il dolore toracico, spesso dovuto a concomitante interessamento pleurico e l'emoftoe. Anche questi sintomi non sono specifici, ma, come per i precedenti, la possibilità di una tubercolosi va sempre tenuta presente.

Dei soggetti che sono stati infettati dal bacillo tubercolare il 5% sviluppa la malattia entro due anni (tubercolosi primaria). Nel rimanente 95% l'infezione rimane latente; questi soggetti, pur essendo perfettamente sani, albergano nel loro organismo bacilli tubercolari ancora vitali seppur in uno stato metabolico particolare detto di dormienza. Nel 5% dei soggetti con

infezione latente i bacilli dormienti tornano, nell'arco della vita, allo stato virulento con comparsa di malattia (tubercolosi post-primaria).

Si considerano contagiosi i pazienti affetti da tubercolosi polmonare bacillifera, cioè quelli che eliminano con l'escreato micobatteri in carica così elevata da poter essere messi in evidenza con l'esame microscopico. Mentre nelle forme tubercolari coltura-positive che si presentano negative all'esame microscopico dell'escreato il rischio di trasmissione della malattia esiste, il contagio può essere sicuramente escluso per i soggetti affetti da tubercolosi extra-polmonare. Il sospetto di malattia tubercolare innesca una sequenza di accertamenti microbiologici, radiologici e specialistici .

### **Diagnosi di infezione / Test basati sulla risposta immunitaria**

L'infezione tubercolare può essere dimostrata mediante la reazione di Mantoux o mediante la ricerca di interferon gamma prodotto dai linfociti ematici dopo stimolazione con antigeni specifici di *M. tuberculosis* (Test IGRA).

Sono test che hanno lo scopo di saggiare l'esistenza di un'infezione tubercolare; perciò, mentre rappresentano uno strumento diagnostico importante di infezione tubercolare latente, per la tubercolosi attiva costituiscono solo uno degli elementi che concorrono alla formulazione della diagnosi clinica.

- Intradermoreazione di Mantoux (TST)

Si basa sulla reazione locale all'inoculazione intradermica di 0,1 ml di soluzione contenente 5 UI di antigene tubercolinico.

- Test immunologici in vitro (IGRA)

Sono test "in vitro", eseguibili su campioni di sangue venoso, basati sul principio che, nei soggetti infettati da MTB, i linfociti T producono interferon gamma specifico se stimolati da antigeni micobatterici: un alto livello di produzione di interferon gamma sarebbe indicativo di infezione tubercolare.

I due sistemi, Mantoux e IGRA, indagano lo stesso fenomeno e forniscono lo stesso tipo di informazione: la negatività è correlata ad assenza di contatto col bacillo tubercolare, la positività presuppone che tale contatto ci sia stato; non permettono tuttavia nessuna speculazione sul tempo intercorso dall'infezione (recente o remota) e sullo stato clinico del paziente (infezione latente o malattia tubercolare). La negatività di tali test non permette di escludere la presenza di infezione tubercolare latente; inoltre non devono mai essere utilizzati da soli per escludere la malattia in soggetti con sintomi o segni compatibili con tubercolosi attiva (falsi negativi).

### **Diagnosi di malattia tubercolare**

Nei confronti della malattia tubercolare, la Microbiologia è in grado di fornire la certezza o il livello di maggior probabilità diagnostica e costituisce il riferimento cardine per la condotta della terapia nelle forme bacillifere.

La diagnosi microbiologica di tubercolosi si basa sul reperto di bacilli tubercolari nel campione clinico. La ricerca di tali microorganismi può essere eseguita con esame microscopico ed esame colturale.

L'esame microscopico è un test rapido ma scarsamente sensibile inoltre la sua positività può essere dovuta a qualsiasi micobatterio e non necessariamente a *M. tuberculosis complex*.

In caso di positività microscopica per batteri alcool acido resistenti va effettuato il test di amplificazione genica direttamente sul campione per discriminare in tempi molto rapidi i micobatteri tubercolari dai non tubercolari.

L'esame colturale richiede tempi abbastanza lunghi ma è molto sensibile, a patto che venga eseguito in parallelo su terreni solidi e liquidi. In caso di crescita di micobatteri in coltura questi devono essere identificati e se l'isolato risulta appartenere al *M. tuberculosis complex* deve essere eseguito l'antibiogramma

## Raccolta, conservazione e invio dei materiali biologici

### RACCOLTA:

- Usare contenitori in plastica, sterili, monouso, con tappo a vite, senza aggiunta di sostanze fissanti o conservanti;
- I tamponi non sono idonei per la raccolta dei materiali biologici;
- Raccogliere i campioni in modo asettico, minimizzando le contaminazioni con il microbiota residente;
- Raccogliere una quantità di materiale biologico sufficiente per i test richiesti;
- Per evitare l'essiccamento di campioni di piccole dimensioni (es.: frammenti biotici) aggiungere alcune gocce di soluzione fisiologica sterile nel contenitore.

Nel caso di sospetta tubercolosi polmonare, bronchiale, tracheale o laringea devono essere inviati 3 campioni di espettorato spontaneo (almeno 5 ml), raccolti di primo mattino in 3 giorni diversi, possibilmente successivi. Se i campioni sono idonei, non c'è indicazione all'invio di ulteriore materiale.

In caso di impossibilità ad ottenere campioni idonei di espettorato, si possono inviare:

- 3 campioni di espettorato indotto
- 3 campioni di aspirato gastrico
- 1 campione di lavaggio bronco alveolare o bronco aspirato

Nel caso di sospetta tubercolosi a localizzazione extrapolmonare, le indagini microbiologiche per micobatteri possono essere eseguite su campioni biologici diversi: linfonodi, pus, biopsie, liquido pleurico, liquido peritoneale, liquido pericardico, liquido articolare, liquor, urine, sangue, .... La ricerca di micobatteri nelle urine deve essere richiesta solo nei casi di sospetta localizzazione genitourinaria (3 campioni di urina in 3 giorni diversi).

Nel caso di secrezioni purulente scarse è possibile la raccolta con tampone sterile (senza terreno di trasporto); immediatamente dopo il prelievo stemperare il tampone in 1-2 mL di fisiologica sterile in provetta sterile.

Tab.1 Specifiche per la raccolta dei campioni per la ricerca di micobatteri

Materiale	Quantità	N°campioni	Campioni non idonei
Aspirato gastrico	>5/10 mL raccolto al mattino a digiuno	3 in giorni consecutivi	Non neutralizzati con carbonato di sodio
Broncoaspirato, BAL	> 5 ml		
Espettorato	5-10 mL raccolto al mattino	3 in giorni consecutivi	Saliva, pool di escreti
Espettorato indotto	5-10 mL raccolto al mattino	3 in giorni consecutivi	Non etichettati come "espettorato indotto"
Feci	> 1 grammo		Campioni congelati
Liquido cefalorachidiano	> 2 mL		
Liquidi cavitari	Almeno 5-10 mL con anticoagulante		
Midollo osseo	Max possibile in Myco- Lytic		Coagulato o in provetta con EDTA
Materiale da lesioni cutanee	Massima quantità possibile		Tamponi con terreno di trasporto

Linfonodo	Linfonodo o porzione di esso in contenitore sterile con fisiologica sterile		Campioni in formalina o altri fissativi
Prelievi biotici	>1 g di tessuto		Campioni in formalina o altri fissativi
Pus	La massima possibile		Tamponi con terreno di trasporto
Sangue	5-10 mL raccolto al mattino	3 a distanza di 24 ore uno dall'altro	Sangue coagulato, o in provetta con EDTA
Sangue mestruale	Alcuni mL raccolti al 2° 3° giorno di flusso in provetta con eparina		Sangue coagulato
Urine	La prima urina del mattino (almeno 40 mL)	3 giorni consecutivi	Urina delle 24 ore, urine da sacca

CONSERVAZIONE: Fino al trasferimento in laboratorio tutti i campioni devono essere conservati in frigorifero, ma non congelati, ad eccezione del sangue che deve essere conservato a temperatura ambiente.

INVIO: il campione dovrebbe pervenire in laboratorio nel tempo più breve possibile, per evitare una eccessiva crescita della flora microbica residente e comunque non oltre le 48 ore dalla raccolta.

### Test per diagnosi di tubercolosi attiva non respiratoria

Il documento emesso nel mese di marzo 2012 da NHS "Diagnosing active tuberculosis" raccomanda di includere sempre, in aggiunta alla richiesta di esame colturale per germi comuni, la ricerca di micobatteri tubercolari nei casi di prelievo dei seguenti materiali: linfonodi, aspirati linfonodali, biopsie pleuriche, liquido pericardico, biopsie in osteomieli e ascessi paravertebrali, biopsie dell'omento e intestinali, pus da ascessi freddi e da ascessi epatici.

Nel caso di sospetta tubercolosi in specifiche localizzazioni anatomiche è indicato il prelievo come dettagliato in tabella 2.

Tab.2 Ricerche sito-specifiche suggerite nella diagnosi e valutazione di tubercolosi non respiratoria

Sito anatomico	Materiali da prelevare
Linfonodo	Linfonodo o aspirato linfonodale
Ossa/articolazioni	Biopsie in osteomieli e ascessi paravertebrali Liquido articolare
Apparato gastrointestinale	Biopsia dell'omento / intestino Liquido ascitico
Apparato genitourinario	Prima urina del mattino Biopsia dal sito di patologia Currettaggio endometriale
Tubercolosi disseminata	Lavaggio broncoalveolare Biopsia del fegato Biopsia da midollo osseo Sangue
Sistema nervoso centrale	Liquido cefalo rachidiano Materiale da biopsia cerebrale o da drenaggio di ascesso cerebrale
Cute	Biopsia dal sito della patologia
Pericardio	Liquido pericardico
Ascessi freddi/epatici	Biopsia dal sito della patologia

In fase diagnostica, l'indagine microbiologica deve sempre essere eseguita mediante esame microscopico ed esame colturale sia in terreno solido che in terreno liquido.

### **Esame Microscopico**

Perchè sia possibile rilevare microscopicamente la presenza di bacilli acido-alcòl resistenti (BAAR), il materiale biologico in esame deve contenerne almeno  $5-10 \times 10^3$  micobatteri per mL. L'osservazione diretta del singolo campione ha una sensibilità che varia da 30% a 80% rispetto alla coltura e dipende dal tipo di campione, dalla specie micobatterica, dal metodo di rilevamento utilizzato e dall'esperienza di chi legge il preparato microscopico.

L'esame microscopico è un elemento importante ai fini della valutazione della contagiosità del paziente, essendo questa direttamente correlata al numero di micobatteri presenti nelle secrezioni polmonari.

La risposta dell'esame microscopico positivo deve essere semiquantitativa (+, ++, +++, +++) e va comunicata al medico richiedente il più precocemente possibile e comunque non oltre 24 ore dal momento del ricevimento del campione.

### **Esame Colturale**

La maggiore sensibilità dell'esame colturale rispetto a quello microscopico (per la coltura sono sufficienti da 10 a 100 micobatteri/mL) ne impone l'esecuzione 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.

Il tempo medio per la coltura di un ceppo di MTB in terreno liquido è di circa 7-15 giorni. Le colture sui tradizionali terreni solidi invece necessitano in media di 3-6 settimane. Tuttavia, alcuni ceppi micobatterici crescono solo sui terreni solidi. L'associazione terreno liquido più terreno solido migliora la sensibilità dell'esame colturale.

La positività dell'esame colturale va comunicata tempestivamente al medico richiedente.

I tempi massimi di refertazione di un esame colturale negativo sono:

- in terreno liquido, 6 settimane
- in terreno solido, 8 settimane

### **Emocoltura**

La ricerca dei micobatteri nel sangue è giustificata nei 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:

- 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> e
  - Non profilassi in atto per Mycobacterium avium complex (MAC)

Materiale biologico:

- sangue da vena periferica (vanno inviati in laboratorio da un minimo di 2 a un massimo di 3 campioni di sangue raccolti in giorni diversi)
- aspirato midollare
- sangue mestruale (in caso di sospetta malattia tubercolare a carico dell'apparato genitale femminile)

## Identificazione

I micobatteri isolati devono essere identificati a livello di specie, poiché tale informazione è cruciale per la diagnosi e la terapia. Di fondamentale importanza dal punto di vista clinico e terapeutico è la differenziazione, che deve essere fatta nel più breve tempo possibile, tra micobatteri appartenenti al *M. tuberculosis complex* e micobatteri non tubercolari.

Poiché i membri del *M. tuberculosis complex* sono patogeni per l'uomo e rispondono allo stesso trattamento (solo il *M. bovis* è naturalmente resistente alla Pirazinamide), è sufficiente l'identificazione a livello di complesso.

L'uso di sonde molecolari è il metodo attualmente più diffuso per l'identificazione delle varie specie di micobatteri.

## Test di sensibilità

Su tutti i ceppi di MTC di primo isolamento deve essere eseguito un test di sensibilità nei confronti dei farmaci di prima linea: Isoniazide, Rifampicina, Pirazinamide, Etambutolo e Streptomicina.

Nei casi di sospetta infezione da bacilli farmaco-resistenti o in seguito a riscontro di resistenze nel test di base, l'indagine si estenderà anche ai farmaci di seconda linea: Amikacina, Capreomicina, Etionamide, Kanamicina, Ofloxacina, Rifabutina, PAS.

Il risultato del test di sensibilità per *M. tuberculosis*, compatibilmente con i tempi di crescita del ceppo, dovrebbe essere mediamente refertato entro 15-30 giorni dal ricevimento del campione.

## Test di amplificazione degli acidi nucleici : utilizzo nella diagnosi di tubercolosi

I test di amplificazione degli acidi nucleici sono in grado di evidenziare la presenza di *Mycobacterium tuberculosis complex* **direttamente** nei campioni clinici con un anticipo di una o più settimane rispetto alla coltura.

I metodi molecolari riducono inoltre il tempo di rilevazione della resistenza ai farmaci antitubercolari a uno-due giorni. L'utilizzo di tecniche molecolari in grado di rilevare rapidamente la resistenza a rifampicina permette l'inizio tempestivo di una terapia efficace, contribuendo a ridurre il periodo di infettività in caso di tubercolosi MDR fino a sei settimane, contenendo la diffusione di micobatteri MDR e migliorando l'outcome terapeutico.

Permette inoltre di predisporre con largo anticipo i test di sensibilità ai farmaci antitubercolari di "seconda linea".

I test di amplificazione degli acidi nucleici trovano indicazione solo nella fase diagnostica e non nel follow-up della tubercolosi. Essi permettono di rilevare la presenza di *M. tuberculosis complex* nel materiale biologico entro poche ore dal prelievo del campione, ma non sostituiscono l'esame microscopico e l'esame colturale poiché amplificano il DNA di micobatteri sia vivi che morti.

L'esame microscopico e l'esame colturale, gold standard di laboratorio per la conferma di tubercolosi, devono invece 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".

## APPROPRIATEZZA

E' appropriata la richiesta di amplificazione genica per MTB, nei seguenti casi:

- Espettorato con microscopia positiva
- Espettorato da pazienti con sospetta tubercolosi polmonare su richiesta motivata del medico curante
- Broncoaspirato e/o BAL da pazienti che vengono sottoposti a broncoscopia per sospetta tubercolosi polmonare
- Broncoaspirato e/o BAL da pazienti immunodepressi che vengono sottoposti a broncoscopia

- Materiali prelevati da siti sterili nei casi di sospetta tubercolosi extrapolmonare

Tab. 2 Algoritmo interpretativo per sospetta TBC polmonare:

AMPLIFICAZIONE	MICROSCOPIA	Ulteriore campionamento	Commento	Interpretazione
+	+	Nessuno	>95% probabilità di TB	Probabile TBC
+	-	Confermare con invio di nuovo campione respiratorio.	Se ampl. + su due campioni iniziare, a giudizio clinico, la terapia antitubercolare (in attesa dei risultati dell'esame colturale)	Possibile TBC
-	+	Inviare nuovo campione respiratorio	Se ampl. - su due campioni e microsc. +: possibile micobatteriosi atipica	Possibile micobatteriosi atipica
-	-	Inviare un nuovo campione respiratorio se fondato sospetto clinico.	Se ampl. - e microsc. - su due campioni: attendere l'esito della coltura; procedere ad ulteriori indagini	TBC improbabile ma non escludibile

Nel caso in cui venga diagnosticata una TBC polmonare non è necessaria l'amplificazione su altre tipologie di materiali biologici (es urine, feci).

Per quanto attiene i materiali prelevati da siti sterili nei casi di sospetta tubercolosi extrapolmonare (es liquido pleurico, pericardio, peritoneale, cefalorachidiano) inviare per amplificazione genica fino ad una massimo di due campioni.

Il laboratorio di Microbiologia e Virologia di Trento utilizza una metodica di amplificazione del DNA di *M.tuberculosis* (Xpert® MTB/RIF®) che contemporaneamente rileva la presenza di MTB e le mutazioni genomiche associate alla resistenza a rifampicina direttamente da campione clinico, mediante l'amplificazione in real time PCR della regione (RRDR) del gene *rpoB*; la presenza di cinque sonde molecular beacon ad alta specificità, che si legano a questa regione del gene, permette l'identificazione delle mutazioni correlate alla resistenza.

Il 95% dei casi di tubercolosi resistenti alla rifampicina sono causati da micobatteri con mutazioni nella regione *rpoB* del gene.

La resistenza a rifampicina è un valido surrogato (valore predittivo positivo > 95%) per tubercolosi MDR nelle aree geografiche a bassa prevalenza di ceppi rifampicina-resistenti.

La sensibilità di tale metodo di rilevazione degli acidi nucleici, secondo la recente letteratura, si attesta sul 98-100% per i campioni con esame microscopico positivo per batteri alcool-acido resistenti e varia dal 47-83% nei campioni con esame microscopico negativo. La specificità riportata è del 98,6%.

La rilevazione di assenza di mutazioni nel gene rpoB indica sensibilità a rifampicina con probabilità > 95 %.

E' disponibile in laboratorio un ulteriore metodo in biologia molecolare di rilevazione della resistenza a rifampicina ed anche a isoniazide di M. tuberculosis, applicabile sia su campione clinico che su ceppo isolato da coltura (GenoType MTBDR).

La resistenza ad isoniazide è associata a mutazioni in geni diversi (katG e inhA).

Nel caso di rilevazione di geni di resistenza a rifampicina (ceppi rpoB +) il laboratorio effettua anche il test molecolare per isoniazide.

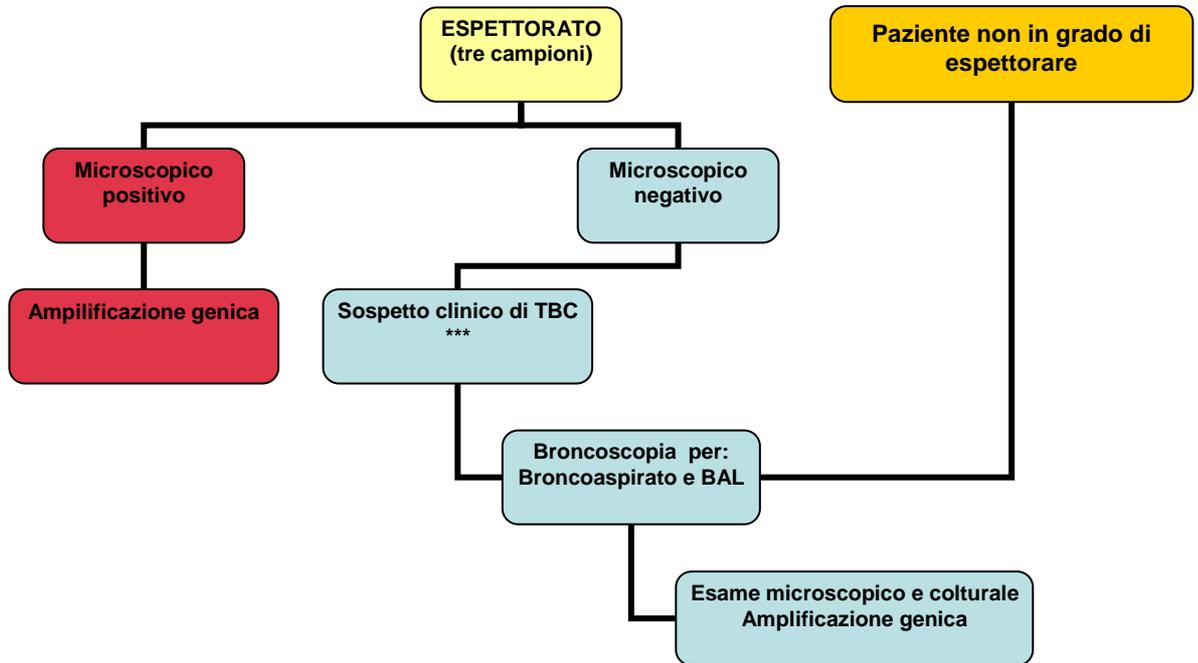
Il clinico può richiedere al laboratorio la rilevazione dei geni di resistenza ad isoniazide, contattando telefonicamente il dirigente responsabile del settore micobatteri del laboratorio di Microbiologia e Virologia di Trento, riservando l'analisi ai seguenti casi: paziente proveniente da zona ad elevata endemia di ceppi MDR, paziente con pregresso trattamento/profilassi antitubercolare, paziente HIV+, paziente affetto da forma grave di TBC (es.TBC meningea, TBC miliare), paziente ancora bacillifero dopo due mesi di terapia.

Segnalare la motivazione nella richieste in Itaca per pazienti ricoverati con nota esplicativa nella specifica finestra dedicata alle NOTIZIE CLINICHE.

I test molecolari di farmacoresistenza sono particolarmente utili per:

- a) Pazienti sospetti o ad alto rischio di avere una tubercolosi resistente ai farmaci
- b) Pazienti gravi in cui le informazioni sulla sensibilità possono modificare le decisioni sulla gestione clinica, come nei pazienti che non migliorano con la terapia con farmaci di prima linea
- c) Epidemie o indagini sui contatti quando è sospettata resistenza nel caso fonte o in persone gravemente immunocompromesse, come quelle infette da HIV, o pazienti in trattamento emodialitico nei quali la conoscenza della sensibilità ai farmaci porta un beneficio significativo e condiziona le decisioni terapeutiche/profilattiche
- d) Per campioni respiratori o ceppi che non possono essere testati con metodi tradizionali (campioni non vitali, colture miste o contaminate).

## Algoritmo per diagnostica microbiologica nel sospetto di tubercolosi polmonare



### \*\*\* Sospetto clinico di TBC in soggetti che presentano almeno uno dei seguenti segni e/o sintomi:

- 1) Tosse persistente da almeno 15 giorni
- 2) Emoftoe e sintomatologia respiratoria e sistemica compatibile con tubercolosi
- 3) Febbre prolungata (>7 giorni) associata a:
  - calo ponderale > 10% del peso ideale negli ultimi tre mesi senza causa nota, o
  - sudorazioni notturne (>1-2 settimane), o
  - fattori di rischio per TB: precedenti clinici di infezione/malattia tubercolare, contatti prolungati e ravvicinati con persone affette da TB attiva, situazioni di elevata promiscuità abitativa, recente immigrazione da paesi ad alta endemia
- 4) Febbre prolungata (>7 giorni) associata a quadro Rx del torace suggestivo di TB (infiltrato apicale, escavazioni, adenopatia ilare, lesioni nodulari/miliariche diffuse).

### Monitoraggio della malattia

Un paziente risultato affetto da tubercolosi bacillifera e messo in terapia deve essere monitorato con esame microscopico a partire dalla terza settimana dall'inizio del trattamento e colturale al termine del secondo mese (NON con amplificazione genica). Nel caso che la positività si protragga oltre due mesi l'antibiogramma deve essere ripetuto su un nuovo isolato per verificare l'eventuale comparsa di resistenze.

### Richiesta microbiologica urgente

Possono essere richieste indagini microbiologiche urgenti per micobatteri tubercolari nel sospetto clinico di tubercolosi bacillifera, secondo i criteri definiti nelle procedure ospedaliere. Il medico richiedente contatta direttamente il dirigente reperibile del laboratorio.

## Comunicazioni del laboratorio

In caso di esiti positivi (microscopici, colturali, amplificazione genica) per MTB il laboratorio assicura la comunicazione tempestiva del risultato al medico curante.

## Le infezioni da Micobatteri non tubercolari (micobatteriosi)

I micobatteri non tubercolari (NTM) sono patogeni opportunisti ampiamente diffusi in natura.

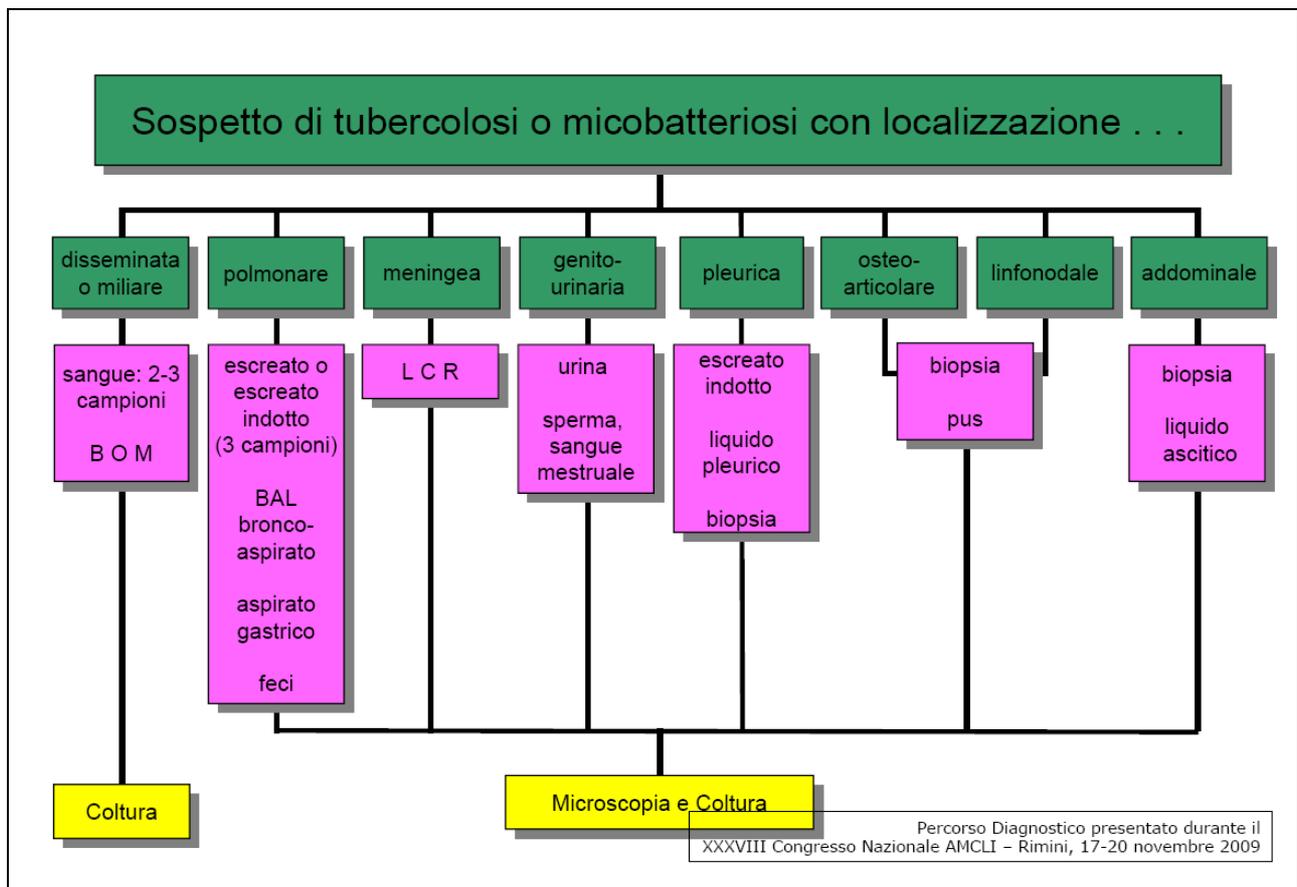
La loro diffusione favorisce la colonizzazione di mucose e secrezioni dell'organismo, nonché la contaminazione di apparecchi diagnostici e campioni biologici.

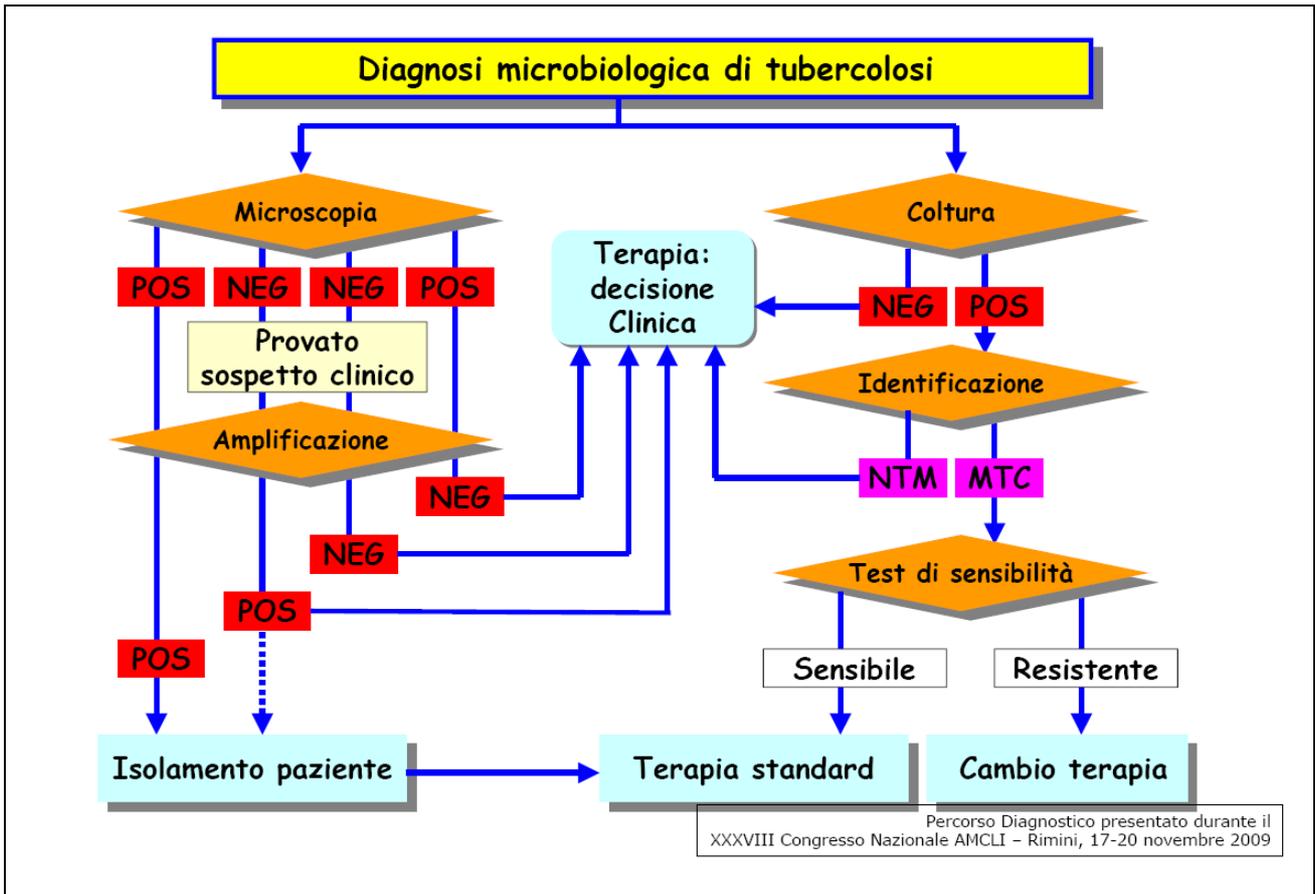
L'isolamento di micobatteri non tubercolari è, in molti casi, privo di significato clinico.

Perché si possa porre diagnosi di malattia da NTM, devono essere contemporaneamente soddisfatti criteri batteriologici e clinico – strumentali:

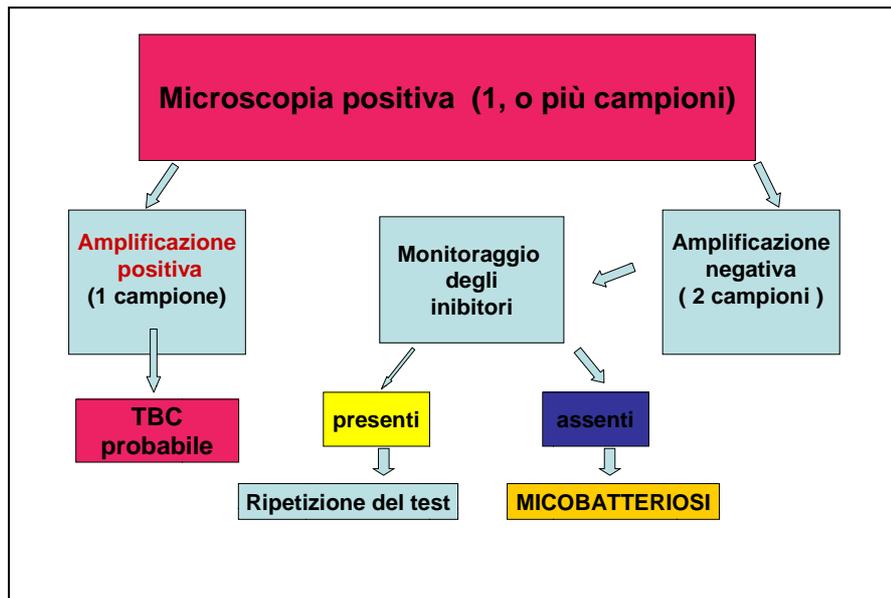
- esami microscopici positivi (da 2 a 4+) e/o isolamenti ripetuti dalla stessa sede;
- crescita di NTM da materiale proveniente da sedi abitualmente sterili;
- clinica e diagnostica per immagini compatibili con la specie isolata, in assenza di altre condizioni o malattie in grado di spiegare il quadro.

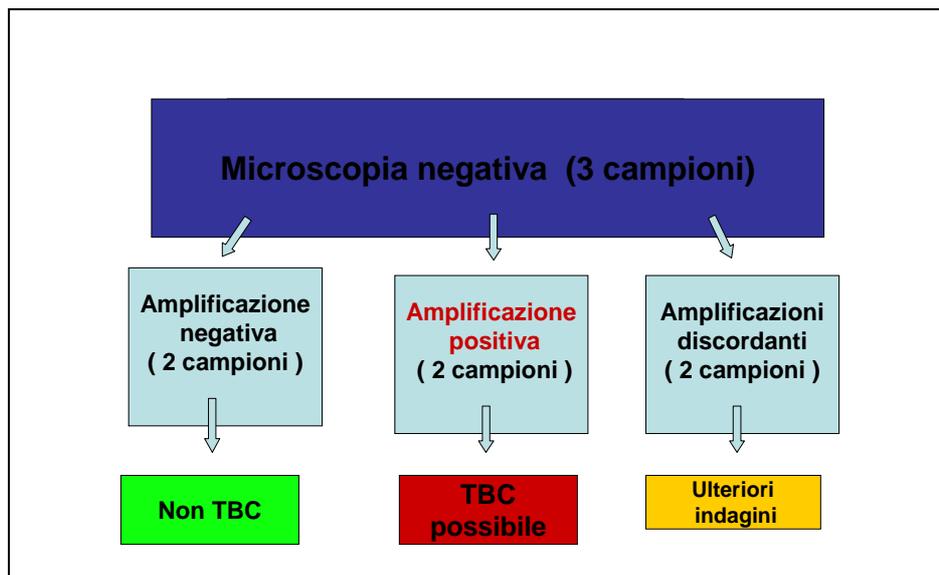
L'antibiogramma su stipti di micobatteri non tubercolari, qualora non sia stata accertata la significatività, non deve essere eseguito. Per gli isolati clinicamente rilevanti l'antibiogramma è raccomandato per le specie a crescita rapida. Per le specie a crescita lenta esso può essere eseguito solo nei casi in cui il trattamento, in base ai protocolli disponibili in letteratura, abbia dimostrato una chiara correlazione tra i risultati del test in-vitro e la efficacia terapeutica (es. *M. avium* complex e claritromicina).





**Test in biologia molecolare direttamente su campione clinico delle vie respiratorie**





## **Bibliografia**

- W.H.O. Global tuberculosis control. Surveillance, Planning, Financing. WHO report 2007. W.H.O., Geneva
- World Health Organization. A Roadmap for Ensuring Quality Tuberculosis Diagnostics Services within National laboratory Strategic Plans. The Global Laboratory Initiative, Advancing TB Diagnostics
- Ministero della Salute e delle Politiche Sociali: Aggiornamento delle raccomandazioni per le attività di controllo della tubercolosi . Protocollo 32190 del 15/7/2009.
- National Collaborating Centre for Clinical Conditions. Royal College of Physicians. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: Royal College of Physicians; 2011. Available from: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/10980/30020/30020.pdf>
- World Health Organization. Manual of basic techniques for a health laboratory, 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2003.
- Master RN. Mycobacteriology. In: Henry D. Isenberg, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Volume 1. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1992. p. 3.01-3.1.6
- European Centre for Disease Prevention and Control. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC; 2011.
- C.L.S.I. Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline. M48-A. Forbes, BA: C.L.S.I., 2008.
- Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C. e Cirillo D. M. Micobatterologia Clinica. 2008. Selecta Medica, Pavia
- Cirillo D, Piana F, Vincent V, Angra P, Barrera L, Boulahbal F, et al. Training package on culture of acid-fast bacilli and drug-susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. In: Tuberculosis Control Assistance Program. TB CAP Toolbox – TB CAP Laboratory Tools [CD ROM]. n.p.; 2009. Available from: [http://www.tbcta.org//Uploaded\\_files/Zelf/NewLabTools1297631626.zip](http://www.tbcta.org//Uploaded_files/Zelf/NewLabTools1297631626.zip)
- Stop TB Partnership and World Health Organization. New Laboratory Diagnostic Tools for TB Control. Geneva, World Health Organization, 2008. Available from: <http://apps.who.int/tdr/publications/non-tdrpublications/diagnostic-tool-tb/pdf/diagnostic-tool-tb.pdf>
- American Thoracic Society. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use ? Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 155: 1804-181
- N.C.C.L.S. Susceptibility testing for mycobacteria, nocardiae and other aerobic actinomycetes; approved standard M24-A. 2003. N.C.C.L.S. Wayne, Pa.
- Drobniewski F, Rüscher-Gerdes S, Hoffner S; Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis (EUCAST document E.DEF 8.1) – report of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Clin Microbiol Infect. 2007 Dec;13(12):1144-56.
- World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO; 2008.
- CDC. Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. MMWR 1996; 45: 950-951.
- CDC. Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. MMWR 2000; 49: 593-594.

- CDC. Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests for the diagnosis of tuberculosis. MMWR 2009; 58: 7-10.
- Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERONTB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep. 2005 Dec 16;54(RR-15):49-55. Erratum in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005 Dec 23;54(50):1288.
- American Thoracic Society. Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007; 175: 367-41
- Percorso diagnostico AMCLI Tubercolosi e micobatteriosi. 2009. [http://www.amcli.it/1Mail/2Lavoro/DbView/Percorsi\\_Diagnostici](http://www.amcli.it/1Mail/2Lavoro/DbView/Percorsi_Diagnostici)
- Traore H, Fissette K, Bastian I, Devleeschouwer M, Portaels F. Detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as initial indicator of multidrug resistance. Int J Tuberc Lung Dis. 2000;4:481-4.
- NHS. Diagnosing active tuberculosis. NICE Tuberculosis pathway. 23 march 2012.
- GIIO, vol.16, n.4, ottobre-dicembre 2009
- Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo D.M. . Micobatteriologia clinica. 2009 Editore Selecta Medica. ISBN/EAN: 9788808180094