



PERCORSO DIAGNOSTICO

TUBERCOLOSI

Gruppo di Lavoro Organizzativo dei Percorsi Diagnostici (GLOPD)

Coordinatore: Cristina Giraldi c.giraldi54@gmail.com
Proprietà intellettuale di AMCLI ETS.

Nel caso i contenuti siano utilizzati è necessario citare il Percorso Diagnostico nel seguente modo: AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Tubercolosi Rif. 2023-18.

REFERENTE

Daniela Maria Cirillo, TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano

GRUPPO DI LAVORO AMCLI MICOBATTERI (GLAMIC)

ESTENSORI DEL DOCUMENTO

Daniela Maria Cirillo, TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano – GLAMIC AMCLI

Emanuele Borroni, TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano- GLAMIC AMCLI

Anna Camaggi, Microbiologia e Vrologia AOU Maggiore della Carità, Novara-GLAMIC

Antonio Curtoni, Microbiologia e Virologia, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino-GLAMIC

Paola Dal Monte, Microbiologia IRCCS AOU Bologna- GLAMIC AMCLI

Leonarda Gentile, Microbiologia e Diagnostica di Immunologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma- GLAMIC AMCLI

Arash Ghodousi, TB Supranational Reference Lab. IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milano- GLAMIC AMCLI

Federica Piana, SS Microbiologia e Virologia AO S. Croce e Carle, Cuneo- GLAMIC AMCLI

Laura Rindi, Dep. of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery University of Pisa, GLAMIC AMCLI

Cristina Russo, Microbiologia e Diagnostica di Immunologia, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma - GLAMIC AMCLI

Stefania Torri, Microbiologia ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano-GLAMIC AMCLI

REVISORI INTERNI

Luigi Ruffo Codecasa, SSD Tisiologia Clinica e Preventiva, Centro Regionale di Riferimento per il Controllo della TB, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Villa Marelli, Milano

Roberto Parrella, UOC Malattie infettive respiratorie Ospedale Cotugno, AO Specialistica dei Colli, Napoli

Marina Tadolini, UO Malattie Infettive IRCCS AOU di Bologna, Bologna

REVISORI ESTERNI

Giorgio Besozzi, Stop TB Italia, Milano

Claudio Scarparo, Microbiologia APSS, Osp. Santa Chiara, Trento

Sommario

ABBREVIAZIONI	
1. LA TUBERCOLOSI - INTRODUZIONE	
1.1. ASPETTI CLINICI	7
1.2. EZIOLOGIA	8
1.3. DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI ATTIVA	9
1.4. TERAPIA	11
BIBLIOGRAFIA 1	11
2. Annesso 1 - FASE PREANALITICA	13
2.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI	13
2.2 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE E TRASPORTO	17
BILIOGRAFIA 2	19
3. Annesso 2 - ESAME MICROSCOPICO	21
3.1 ESECUZIONE DELLO STRISCIO: associazione	2
3.2 COLORAZIONE microbiologi	22
3.2.1 COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELSEN (CARBOLFUCSINA A CALDO)	
3.2.2. COLORAZIONE DI KINYOUN (CARBOLFUCSINA A FREDDO)	
3.2.3. COLORAZIONE FLUOROCROMICA CON AURAMINA E SUE VARIANTI	
3.3. OSSERVAZIONE MICROSCOPICA	
3.4. MICROSCOPIA A LED	24
3.5. REFERTAZIONE	
BIBLIOGRAFIA 3	25
4. Annesso 3 - DECONTAMINAZIONE E COLTURA	26
4.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	26
4.2. DECONTAMINAZIONE	27
4.3. ESAME COLTURALE	27
4.3.1. COLTURA IN TERRENO SOLIDO	27
4.3.2. COLTURA IN TERRENO LIQUIDO	
4.4. EMOCOLTURA	
4.5. CONTROLLO DI QUALITÀ	29
4.6. CROSS-CONTAMINAZIONI	29
4.7. REFERTAZIONE	30

	BIBLIOGRAFIA 4	3
	Annesso 4 - RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI MTB DA CAMPIONI LINICI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE GENICA	32
	5.1. TEST MOLECOLARI RACCOMANDATI DALL'OMS PER LA DIAGNOSI RAPIDA DI TB E DR-TB	33
	5.1.1. XPERT MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)	33
	5.1.2. Truenat MTB e MTB-RIF DX (Molbio Diagnostics, Goa, India)	34
	5.1.3. RealTime MTB e RealTime MTB RIF/INH (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)	34
	5.1.4. BD MAX™ MDR-TB Becton Dickinson (BD)	34
	5.1.5. FluoroType MTB e FluoroType MTBDR (Bruker/HAIN Lifescience, Nehren, Germany)	34
	5.1.6. Cobas® MTB e cobas® MTBRIF/INH (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanto CA, USA)	
	5.1.7. GenoType MTBDRplus e GenoType MTBsl (Bruker/HAIN Lifescience, Nehren, Germany)	3
	5.1.8. Genoscholar™ PZA-TB (Nipro, Osaka, Giappone) Ci C Z i O N E	3
	5.2. PROGRAMMI DI VALUTAZIONE ESTERNA DI QUALITÀ	35
	BIBLIOGRAFIA 5 Clinici italiani	36
	Annesso 5 DETERMINAZIONE MOLECOLARE DELLA FARMACO ESISTENZA Ente del Terzo Settore	37
	6.1. BASI MOLECOLARI DELLA FARMACO-RESISTENZA IN MTB	37
	6.1.1. RIFAMPICINA, ISONIAZIDE ED ETIONAMIDE	3
	6.1.2. ETAMBUTOLO E PIRAZINAMIDE	3
	6.1.3. AMINOGLICOSIDI E PEPTIDI CICLICI	38
	6.1.4. FLUOROCHINOLONI	38
	6.2. RESISTENZE CROCIATE	38
	6.3. IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DEL PROFILO DI RESISTENZA DI MTB.	38
	6.3.1. LA TECNOLOGIA LINE PROBE ASSAY	3
	6.3.2. IL SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA (WGS)	40
	6.4. DISCORDANZE FENOTIPO/GENOTIPO	40
	BIBLIOGRAFIA 6	4
7.	Annesso 6 - IDENTIFICAZIONE DI MTB	44
	7.1. TEST IMMUNO-CROMATOGRAFICO PER L'IDENTIFICAZIONE RAPIDA DEI CEPPI APPARTENENTI AL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX	44
	7.2. IDENTIFICAZIONE MEDIANTE LPA	

	BIBLIOGRAFIA 7	.45
8.	Annesso 7 - TEST FENOTIPICI DI SENSIBILITÀ AI FARMACI	. 46
	8.1. SAGGIO DI SENSIBILITA' SU TERRENO SOLIDO (METODO DELLE PROPORZIONI)	.46
	8.2. SAGGIO DI SENSIBILITA' IN TERRENO LIQUIDO CON IL SISTEMA MGIT	. 47
	8.3. SAGGIO DI SENSIBILITA' IN MICRODILUIZIONE CON IL SISTEMA SENSITITRE	. 47
	8.4. SAGGIO DI SENSIBILITA' AI FARMACI DI SECONDA LINEA	. 47
	8.4.1 – SCENARI E NUOVE STRATEGIE	47
	8.4.2. – METODOLOGIA	48
	BIBLIOGRAFIA 8	51
	Annesso 8 – NGS PER LA DIAGNOSI DELLA TB E IL CONTROLLO DELLA RASMISSIONE	
	9.1. METODI ATTUALI E MARCATORI GENETICI UTILIZZATI PER GLI STUDI EPIDEMIOLOGICI MOLECOLARI	
	9.2. SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE PER LA GESTIONE DELLA TUBERCOLOSI	. 53
	9.3. SEQUENZIAMENTO INTERO VS MIRATO	
	9.4. WGS PER IDENTIFICAZIONE DEI LINEAGES E DEFINIZIONE DELLE TRASMISSIONI	.55
	9.5. TARGETED NGS	.55
	BIBLIOGRAFIA 9	61
10	. Annesso 9 - LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA	
	10.1. MODALITÀ DI CONTAGIO	
	10.2. PROCEDURE E PRATICHE MICROBIOLOGICHE STANDARD	
	10.3. PRATICHE SPECIALI	
	10.4. EQUIPAGGIAMENTO DI BIOSICUREZZA RACCOMANDATO	
	10.5. IL LABORATORIO DI CONTENIMENTO 3	
	BIBLIOGRAFIA 10	
11	Annesso 10 - TUBERCOLOSI IN ETÀ PEDIATRICA	
•••	BIBLIOGRAFIA 11	
		. 5/

ABBREVIAZIONI

ATS American Thoracic Society

ATCC American Type Colture Collection

BAAR Bacilli alcol-acido-resistenti

CLSI The Clinical & Laboratory Standards Institute

ECDC European Centre for Disease Prevention and Control

ERS European Respiratory Society

IDSA Infectious Diseases Society of America

LED Light-emitting diod LPA Line Probe Assay

MDR-TB Multidrug resistant (resistenti ad almeno rifampicina e isoniazide)

MTB Mycobacterium tuberculosis complex

Concentrazione minima inibente MIC NGS **Next Generation Sequencing**

Organizzazione Mondiale della Sanità **OMS**

RIF Rifampicina

associazione RR-TB Tubercolosi resistente alla rifampicina **SNP** Single nucleotide polymorphism

TB Tubercolosi

TB pre-XDR Tubercolosi Pre-extensively drug resistant (ceppo resistente, oltre

che a rifampicina e isoniazide anche ai fluorochinoloni)

XDR-TB Extensively drug resistant sono MDR resistenti anche ai

fluorochinoloni e ad almeno un altro farmaco di gruppo A

(bedaquilina o linezolid)

WGS Whole genome sequencing

1. LA TUBERCOLOSI - INTRODUZIONE

La TB è una malattia infettiva contagiosa con obbligo di notifica. L'infezione tubercolare in soggetti esposti può rimanere tale o evolvere in modo progressivo in tubercolosi incipiente (in cui mancano ancora segni e sintomi di malattia), tubercolosi subclinica (il soggetto è asintomatico ma presenta segni radiologici minimi e/o test molecolare positivo) e malattia tubercolare attiva.

La TB è curabile con regimi antitubercolari standard, ma trattamenti inadeguati possono determinare lo sviluppo di resistenze che rendono la guarigione problematica. La TB farmacoresistente (MDR-TB se resistente a rifampicina ed isoniazide, preXDR TB se resistente anche ai fluorochinoloni, XDR-TB se alla resistenza ai fluorochinoloni si aggiunge la resistenza a bedaquilina e/o linezolid) è una forma di tubercolosi grave che richiede un trattamento con regimi appropriati e che deve essere diagnosticata e gestita solo in centri di riferimento adeguati.

L'Italia è un Paese a bassa endemia; da molti anni la prevalenza dei casi di TB è <7/100.000 abitanti; come in tutti i Paesi a bassa endemia, i casi si concentrano nelle grandi aree urbane e nella maggior parte dei casi colpiscono popolazione nata in paesi a media e alta endemia di malattia.

1.1. ASPETTI CLINICI

La TB può colpire qualsiasi distretto dell'organismo, la forma più importante è quella riguardante le vie respiratorie, sia perché è di gran lunga la più frequente, sia perché è l'unica coinvolta nella diffusione del contagio. Il contagio si realizza mediante l'eliminazione dell'agente eziologico con i colpi di tosse, all'interno di goccioline di saliva; tali goccioline, una volta inalate, propagano l'infezione. Una volta infettatisi, la probabilità di ammalarsi di tubercolosi è del 10%.

associazione

Dei soggetti che si ammaleranno, il 50% svilupperà la malattia entro un paio di anni, l'altro 50% durante il resto della vita; i bacilli dormienti possono infatti tornare, nell'arco della vita dell'ospite, allo stato virulento determinando la comparsa di malattia. Il restante 90% dei casi, in cui non si svilupperà malattia attiva, include soggetti con risposta immunitaria ad antigeni specifici, sia che abbiano completamente eliminato il patogeno, sia che continuino ad ospitarlo in vari stadi di replicazione. Si parla in quest'ultimo caso di infezione tubercolare.

Le principali forme di TB extra-polmonare possono interessare pleura, sistema nervoso, linfonodi, ossa e apparato urogenitale. Esiste anche una forma disseminata nota come TB miliare, polmonare o sistemica.

I sintomi/segni della tubercolosi includono febbricola, sudorazioni notturne, perdita di peso e astenia; nella TB delle vie respiratorie la tosse è il sintomo più evidente e spesso si accompagna ad espettorazione, più raramente ad emottisi.

Si considerano contagiosi i pazienti affetti da tubercolosi bacillifera delle vie respiratorie che eliminano con l'escreato micobatteri in carica così elevata da poter essere messi in evidenza con l'esame microscopico, tuttavia il rischio di contagio, seppur minore, esiste anche nelle forme coltura-positive a bassa carica, che si presentano negative all'esame microscopico.

Non sono considerati invece contagiosi i soggetti affetti da tubercolosi esclusivamente extrapolmonare (con l'eccezione di soggetti con tubercolosi del cavo orofaringeo).

1.2. EZIOLOGIA

Il principale agente eziologico della TB è il *Mycobacterium tuberculosis*, ad esso si aggiungono gli altri membri del *M. tuberculosis* complex fra i quali i più frequentemente coinvolti sono *M. bovis* e *M. africanum. Mycobacterium tuberculosis* comprende numerosi "lineages" spesso caratteristici di particolari aree geografiche e con caratteristiche di farmacoresistenza e virulenza differenti (Fig. 1) [9].

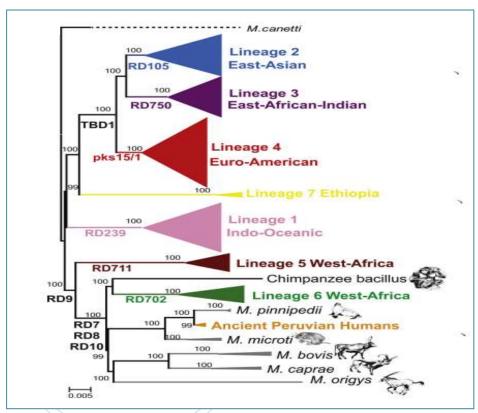


Fig. 1. Lineages di *Mycobacterium tuberculosis* complex. https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.012.

I micobatteri, in virtù dell'alto contenuto lipidico della parete, possiedono una caratteristica tintoriale, nota come alcol-acido resistenza, che con specifiche tecniche di colorazione, ne permette il riconoscimento all'osservazione microscopica. Anche la velocità di crescita in coltura, particolarmente lenta, li differenzia dagli altri batteri. L'agente della TB è un patogeno obbligato quindi il suo isolamento pone automaticamente la diagnosi di TB.

Il bacillo tubercolare è un agente biologico di gruppo 3 (che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche). È pertanto necessario che particolare attenzione venga posta alla tutela della salute e alla sicurezza degli operatori sanitari (vedi *Annesso* 9).

1.3. DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI ATTIVA

Si basa su: presenza di sintomi/segni di malattia, diagnostica per immagini e indagini microbiologiche. Particolarmente complessa è la diagnosi in soggetti di età pediatrica (vedi *Annesso 10*) e/o immunodepressi.

La richiesta degli esami microbiologici è appropriata quando il sospetto di tubercolosi, basato su quadro clinico e radiologico, sia elevato. La richiesta in presenza di moderato sospetto clinico può essere giustificata soltanto nel caso di pazienti immunodepressi o pediatrici o in soggetti asintomatici contatti recenti di un caso di TB.

Il materiale sottoposto ad esame microbiologico deve provenire dalla sede della sospetta infezione. L'attendibilità del risultato dipende dalle modalità di raccolta, trasporto e conservazione del campione (vedi Annesso 1).

Test microbiologici per TB polmonare o laringea

Il test raccomandato per la diagnosi di tubercolosi polmonare è oggi il test molecolare per la ricerca di frammenti specifici del genoma di *M. tuberculosis* complex. Ci sono diversi test commerciali, alcuni raccomandati specificamente dall'OMS come test iniziale per la diagnosi sulla base delle caratteristiche di sensibilità e specificità [1, 2], altri approvati come IVD nel mercato europeo (*vedi Annesso 4*).

L'esame microscopico per la ricerca di bacilli alcol-acido resistenti (BAAR) può essere utilizzato per la valutazione semiquantitativa della carica batterica (dato ottenibile anche da alcuni test molecolari), importante per determinare la contagiosità del paziente e per monitorare (in campioni consecutivi) la terapia. Il test è poco sensibile, in quanto cariche basse (<5000 BAAR/mL) non vengono rilevate ed è poco specifico, in quanto non distingue i micobatteri tubercolari dai MNT. Il test microscopico (*vedi Annesso 2*), accompagnato dalla coltura è invece fondamentale per il monitoraggio della risposta alla terapia.

Un test di amplificazione negativo in presenza di microscopia positiva rende assai improbabile la diagnosi di TB, deponendo per infezione da NTM. Un test di amplificazione positivo in presenza di microscopia negativa può risultare diagnostico in presenza di elevato sospetto clinico. Un test di amplificazione negativo in presenza di microscopia negativa non esclude la diagnosi di TB. Qualora il test di amplificazione abbia dato esito positivo e non includa il rilevamento della resistenza alla rifampicina, quest'ultimo deve essere eseguito con metodi molecolari alternativi. In caso di rilevamento di resistenza alla rifampicina è consigliata anche la ricerca molecolare di resistenze all'isoniazide e ai fluorochinoloni. Esistono tecniche, basate sul sequenziamento di nuova generazione che permettono di evidenziare direttamente dal campione clinico i determinanti di resistenza ai farmaci.

Per la coltura, da eseguire previa decontaminazione, è raccomandato l'impiego di terreni liquidi e solidi (vedi Annesso 3).

Eventuali bacilli alcol-acido resistenti cresciuti in coltura devono essere identificati mediante test immunocromatografico o molecolare. Il test immunocromatografico può risultare falsamente negativo in alcuni ceppi (vedi Annesso 6).

Per i pazienti che non espettorano o con microscopia negativa in presenza di sospetto elevato, è consigliata l'induzione dell'espettorato mediante aerosol con soluzione salina. In alternativa all'espettorato indotto possono essere eseguiti broncoaspirato o lavaggio broncoalveolare (BAL).

È attualmente in corso di valutazione l'uso del tampone linguale come materiale diagnostico per la diagnosi di malattia tubercolare [3].

In presenza di sospetto di TB miliare, se l'espettorato indotto è negativo sono consigliati,

broncoaspirato o BAL ed eventualmente la biopsia trans-bronchiale nonché l'esecuzione di emocolture o la coltura da midollo emopoietico.

Per i pazienti pediatrici non in grado di espettorare si può ricorrere al test molecolare sulle feci o all'aspirato gastrico, su tre campioni.

I principali test diagnostici per la TB extrapolmonare includono:

TB del sistema nervoso centrale: TAC o RMN più esami microbiologici molecolari e colturali su biopsia o liquor (l'esame microscopico su liquor non è raccomandato per la bassa sensibilità);

TB linfonodale: ecografia, TAC o RMN più esami microbiologici su biopsia o agoaspirato;

TB pericardica: ecocardiogramma più esami microbiologici su biopsia o liquido pericardico;

TB gastrointestinale: ecografia, TAC, endoscopia o laparoscopia più esami microbiologici su biopsia o liquido ascitico;

TB osteoarticolare: radiografia, TAC o RMN più esami microbiologici su biopsia o agoaspirato; $\alpha \ s \ s \ o \ c \ i \ \alpha \ z \ i \ o \ n \ e$

TB disseminata: ecografia, TAC o RMN più esami microbiologici su biopsia osteomidollare, BAL, sangue, liquor;

TB cutanea: esami microbiologici su biopsia;

TB pleurica: Rx, TAC, toracoscopia più esami microbiologici su biopsia o liquido pleurico;

TB renale e distretto genito-urinario: ecografia, TAC, uro-TAC più esami microbiologici su urina, sperma o biopsia.

L'amplificazione genica, l'esame microscopico e colturale sono raccomandati anche per i campioni provenienti da sedi di sospetta TB extra-polmonare. In tali campioni i falsi-positivi sono improbabili, mentre i falsi-negativi sono molto frequenti a causa della bassa carica presente.

La determinazione molecolare dei determinanti di resistenza a rifampicina deve essere eseguita sul materiale diretto in tutti i casi a rischio di rifampicina-resistenza [4].

Nei casi in cui si accerti la resistenza alla rifampicina, il campione deve essere valutato mediante metodiche molecolari per la presenza di un ceppo resistente anche a isoniazide e fluorochinoloni in modo da poter indirizzare la terapia con farmaci di seconda linea in modo corretto.

Sono oggi disponibili test molecolari, basati sulla NGS ed eseguibili su campioni con microscopia positiva, in grado di fornire indicazioni sulla presenza di determinanti di resistenza ai principali antitubercolari [4].

Il test di sensibilità fenotipico è ancora oggi raccomandato per tutti i pazienti colturapositivi. In caso di resistenza a rifampicina o di resistenza contemporanea a isoniazide e
rifampicina è richiesta la valutazione della sensibilità anche ai farmaci utilizzati oggi per
il trattamento della TB-MDR: fluorochinoloni, bedaquilina, linezolid, clofazimina,
nitroimidazoli (pretomanid e delamanid). La resistenza a bedaquilina, pretomanid,
delamanid deve essere effettuata in centri di riferimento regionali o nazionali che
partecipino ad un controllo di qualità esterno per tali farmaci (vedi Annesso 7). Le linee

guida di alcuni paesi europei raccomandano il WGS sul ceppo isolato in coltura e l'antibiogramma sui soli ceppi che presentano almeno un determinante genetico associato a resistenza su qualunque dei geni considerati nell'algoritmo (vedi Annesso 5).

Tutti i ceppi MDR devono essere inviati al laboratorio sovranazionale di riferimento per il sequenziamento e le sequenze vengono depositate presso la piattaforma EpiPulse dell'ECDC.

1.4. TERAPIA

Il numero dei farmaci disponibili per il trattamento della TB è piuttosto limitato.

I farmaci di prima linea che vengono impiegati per il trattamento della TB farmacosensibile, includono isoniazide (I), rifampicina (R), etambutolo (E) e pirazinamide (P).

La terapia standard per la TB sensibile ai farmaci prevede una fase intensiva di 2 mesi con R, I, E e P, ed una fase di mantenimento di quattro mesi con R ed I. È consigliato l'uso di compresse con associazione di farmaci a dose fissa. Oggi è raccomandata una terapia breve, di quattro mesi che utilizza la rifapentina (ad oggi non disponibile in Italia) in associazione a isoniazide, pirazinamide e fluorochinolone. Il trattamento per la TB isoniazide-resistente include l'uso del fluorochinolone.

La terapia della TB-MDR è in continua evoluzione nel tentativo di utilizzare un regime solo orale, breve e a tossicità limitata. Nei pazienti con TB-MDR non precedentemente trattati per TB-MDR e per cui siano state escluse resistenze a chinoloni e bedaquilina può essere utilizzato un regime breve (6-9 mesi) con pretomanid, bedaquilina, linezolid, moxifloxacina. Nel caso di resistenza alla moxifloxacina questa viene esclusa. Nel caso di resistenze a bedaquilina e linezolid è raccomandato un regime lungo personalizzato sulla base dell'antibiogramma che includa almeno 5 farmaci scelti secondo le linee guida dell'OMS. In ogni caso la terapia della TB-MDR deve essere effettuata solo da personale esperto e sotto stretto controllo clinico [6, 7, 8].

BIBLIOGRAFIA 1

- 1. Practical manual on tuberculosis laboratory strengthening, 2022 update. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 2. WHO operational handbook on tuberculosis Module 3: Diagnosis rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update (https://apps.who.int/iris/handle/10665/342369)
- Adama et al. Accuracy of tongue swab testing using Xpert MTB-RIF Ultra for tuberculosis diagnosis ASM Journals, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 60, No. 7 DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.00421-22
- 4. National Institute of Care and Health Excellence. Tuberculosis. NICE guideline. 2016. http://nice.org.uk/guidance/ng33
- Bonnet I, Enouf V, Morel F, Ok V, Jaffre J, Jarlier V, Aubry A, Robert J and Sougakoff W (2021) A Comprehensive Evaluation of GeneLEAD VIII DNA Platform Combined to Deeplex Myc-TB® Assay to Detect in 8 Days Drug Resistance to 13 Antituberculous Drugs and Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Directly From Clinical Samples. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:707244. doi: 10.3389/fcimb.2021.707244
- 6. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment tuberculosis care and support. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

- 7. Rapid communication: key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2022 (WHO/UCN/TB/2022.2). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 8. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 9. Mireia Coscolla, Sebastien Gagneux, Consequences of genomic diversity in Mycobacterium tuberculosis, Seminars in Immunology, Volume 26, Issue 6,2014,Pages 431-444, ISSN 1044-5323, https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.012.



2. Annesso 1 - FASE PREANALITICA

La resa diagnostica dei test microbiologici dipende in larga misura dalla probabilità pretest, ovvero dalla probabilità che il paziente in esame abbia realmente un'infezione dovuta al microrganismo oggetto della ricerca [1].

Perché la probabilità pre-test di una malattia da micobatteri sia sufficientemente elevata è necessario che:

in caso di localizzazione polmonare, siano presenti:

- sintomi tipici (tosse, febbre e sudorazioni notturne di durata superiore alle 3 settimane, accompagnate o meno da emottisi) oppure sintomi compatibili (espettorazione, calo ponderale);
- associazione con quadri radiologici del torace caratteristici (lesioni cavitarie o nodulari, infiltrati alveolari o interstiziali localizzati prevalentemente ai lobi superiori o al segmento apicale del lobo inferiore), oppure con quadri radiologici compatibili (adenopatia ilare, addensamenti parenchimali, atelettasia, versamento pleurico, bronchiectasie) [2] oppure con il rilevamento, all'esame TAC del torace, di noduli centrolobulari con aspetto di "albero in fiore";

in caso di localizzazione extrapolmonare, siano presenti:

- segni e sintomi localizzati associati a diagnostica per immagini compatibile con infezione da micobatteri [3].

microbiologi

Importanti eccezioni riguardano:

- i pazienti gravemente immunodepressi (in particolare HIV-positivi), che possono presentare gravi forme polmonari anche in assenza di lesioni radiologiche [4, 5];
- i pazienti pediatrici (<10 anni di età), nei quali si può avere scarsa sintomatologia clinica associata a opacità polmonari e adenopatia ilare [6,7].zo Settore

Il materiale da inviare in laboratorio deve essere prelevato dal distretto corporeo sede della sospetta infezione, anche nel caso in cui sia necessario adottare procedure invasive (Tab. 1).

L'attendibilità dei risultati dipende dalle modalità con cui i campioni sono stati prelevati, trasportati e conservati.

2.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il prelievo del materiale deve essere effettuato:

- · prima dell'inizio della terapia antibiotica; è tuttavia possibile inviare campioni successivi per il follow-up del paziente in terapia;
- in modo sterile, per evitare contaminazioni;
- in quantità adequata, per evitare falsi negativi;
- in un numero adeguato di campioni, per evitare falsi negativi;
- evitando, ove possibile, l'uso di tamponi;
- utilizzando contenitori monouso sterili, con tappo a vite;
- senza l'aggiunta di conservanti o fissativi;
- facendo attenzione a non contaminare la superficie esterna del contenitore con il materiale biologico.

Il contenitore deve essere contrassegnato con un'etichetta indicante i dati anagrafici del paziente, il tipo di materiale, la sede di prelievo, la data e l'ora di raccolta.

Le indicazioni sulla modalità di raccolta dei micobatteri sono riportate nella Tabella 1.

La localizzazione di gran lunga più frequente delle infezioni micobatteriche è quella polmonare; pertanto, la maggioranza dei campioni è rappresentata da materiale di origine respiratoria.

Espettorato

Due campioni di ≥ 3 ml devono essere raccolti nella stessa giornata o in giorni diversi di cui almeno uno di primo mattino. I campioni prelevati la mattina presto (cioè poco dopo il risveglio del paziente) hanno la massima resa [8].

Al fine di ottenere un campione adeguato per qualità e quantità è preferibile che il paziente sia assistito da personale qualificato durante la raccolta [8, 9].

L'espettorato deve provenire dalle basse vie aeree, espulso con un colpo di tosse. Il campione non deve essere costituito da saliva o contaminato da secrezioni nasofaringee. La raccolta nello stesso contenitore di escreati prelevati in momenti diversi non è accettabile.

Espettorato indotto

Se il paziente ha difficoltà nell'espettorare spontaneamente si può ricorrere all'induzione facendogli inspirare, lentamente e profondamente per un periodo di 15-20 minuti, un aerosol di soluzione salina ipertonica generato sterilmente da un nebulizzatore ultrasonico [10]. Per evitare rischi di trasmissione nosocomiale, l'induzione aerosolica deve essere eseguita in condizioni di isolamento respiratorio. La procedura per la raccolta dell'espettorato indotto è ben tollerata da tutti i pazienti, bambini inclusi.

Poiché l'aspetto dell'espettorato indotto è quasi sempre salivare, si raccomanda di segnalare al laboratorio la natura del materiale, per evitare che possa essere considerato non idoneo.

Ente del Terzo Settore

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 [11] e pari, o addirittura superiore, a quella dei materiali raccolti mediante broncoscopia [9, 12]. L'escreato indotto risulta vantaggioso rispetto alla broncoscopia anche dal punto di vista del rapporto costo/beneficio [2].

Broncoaspirato, lavaggio bronco-alveolare, aspirato trans-bronchiale

I campioni prelevati tramite broncoscopia sono diventati oggi i materiali respiratori più frequentemente utilizzati dopo gli espettorati.

Tale ricerca è giustificata solo nel caso in cui la ricerca su escreato abbia dato esito negativo su più campioni, in particolare in pazienti con lesioni cavitarie o infiltrati polmonari, e nei soggetti immunodepressi sia in presenza che in assenza di anormalità radiologiche del polmone.

La resa diagnostica del broncolavaggio è superiore a quella dell'aspirato gastrico [13], ma uguale, o lievemente inferiore, a quella dell'escreato e dell'escreato indotto [12, 14]. Una buona resa diagnostica caratterizza i campioni di escreato raccolti subito dopo l'esecuzione della broncoscopia. Il volume del prelievo di broncoaspirato e lavaggio bronco-alveolare non deve essere inferiore a 3 mL [6]. I broncoscopi devono essere disinfettati accuratamente per evitare cross-contaminazioni [15, 16].

Aspirato gastrico

L'aspirato gastrico, riservato ai casi in cui il paziente non sia in grado di espettorare spontaneamente o dopo induzione aerosolica, è il più comunemente impiegato nei bambini.

Va eseguito al mattino, quando il paziente è a digiuno da almeno otto ore, utilizzando 25-50 mL di acqua distillata sterile. La procedura, eseguita in 3 giorni consecutivi, richiede l'ospedalizzazione del paziente e la disponibilità di ambienti idonei all'isolamento respiratorio ed è controindicata in bambini affetti da diatesi emorragiche o con basso numero di piastrine.

Il pH del campione deve essere neutralizzato entro un'ora dal prelievo, aggiungendo carbonato di sodio [8].

Liquidi cavitari

I materiali contenuti in raccolte chiuse, quali liquido pleurico, pericardico, sinoviale, ascitico e peritoneale, devono essere prelevati usando tecniche di aspirazione o procedure chirurgiche più complesse.

Devono essere usate provette con anticoagulante, poiché il liquido prodotto nel corso di una reazione infiammatoria (essudato) può contenere fibrinogeno. Dato che l'EDTA è tossico per i micobatteri e l'eparina può inibire la Taq polimerasi, l'anticoagulante di riferimento è il citrato trisodico. Il volume consigliato è di almeno 15 mL [17].

L'espettorato indotto si è dimostrato più efficace del liquido pleurico e inferiore alla sola biopsia pleurica, per la diagnosi microbiologica di pleurite tubercolare [18].

Nei pazienti immunocompetenti con pleurite tubercolare diagnosticata istologicamente, la coltura del liquido pleurico è positiva in meno del 40% dei casi, mentre tale percentuale risulta molto più elevata nel caso in cui il campione venga prelevato da un empiema pleurico. Infatti la pleurite è prevalentemente reattiva nel primo caso, mentre è sicuramente legata alla presenza dell'agente eziologico nel secondo. Stando così le cose, la coltura del liquido pleurico dovrebbe essere richiesta basandosi sulla presenza di fattori predittivi di malattia tubercolare, quali un forte sospetto clinico, una pleurite metapneumonica o un empiema pleurico [18]

Liquido cefalo-rachidiano (liquor)

Occorre prelevarne il massimo volume possibile. Per un esame adeguato sono necessari non meno di 2-3 mL [6].

Nel caso in cui non si possa disporre della quantità indicata, i test debbono essere eseguiti a partire da quello di maggiore sensibilità indipendentemente dalla richiesta del clinico.

Si eseguirà per prima l'amplificazione genica utilizzando test molecolari ad alta sensibilità, poi la coltura. La microscopia ha una sensibilità molto bassa anche dopo concentrazione del liquor [19].

Materiali necrotico-purulenti

Fatta eccezione per i casi di drenaggio spontaneo (tragitti fistolosi da linfonodi colliquati o apertura all'esterno di raccolte ascessuali), i materiali necrotico-purulenti vengono raccolti tramite agoaspirato transcutaneo.

La tecnica dell'agoaspirato può essere applicata anche a linfonodi o a masse localizzate in sede mediastinica, endoaddominale e/o retroperitoneale, eseguendo il prelievo in corso di broncoscopia o di endoscopia dell'apparato digerente [20].

L'uso del tampone deve essere limitato ai casi in cui il prelievo con siringa non sia possibile; in tali casi si stempera il materiale prelevato dalla lesione in 2-3 mL di soluzione fisiologica sterile, ripetendo l'operazione più volte fino ad ottenere un campione piuttosto denso. I materiali raccolti mediante tamponi posti in terreno di trasporto agarizzato non sono idonei [17].

Urine

Dopo pulizia accurata dei genitali esterni, si raccolgono almeno 50 mL di urina includendo anche il primo mitto [17]; la modalità di raccolta mediante mitto intermedio è sconsigliata.

È raccomandato l'invio di 3 campioni della prima urina del mattino raccolti in giorni consecutivi [8]. In alternativa il prelievo può essere effettuato mediante cateterizzazione o con puntura sovrapubica.

La raccolta delle 24 ore o le urine da sacca non sono utilizzabili a causa della frequenza con cui si verificano contaminazioni. Pazienti sottoposti ad antibioticoterapia ad ampio spettro possono eliminare con le urine sostanze capaci di inibire o ritardare la crescita dei micobatteri (in particolare i chinoloni).

L'OMS suggerisce di utilizzare urine (LF-LAM) per la diagnosi di tubercolosi attiva in adulti, adolescenti e bambini sieropositivi con segni e sintomi di tubercolosi (polmonare e/o extrapolmonare) o gravemente malati in regime ambulatoriale [6, 7, 24, 26].

Tale test non è disponibile in Europa; test di nuova generazione sempre basati sulla determinazione del LAM secreto, sono in fase di valutazione [24, 25, 26]

Ciò che consente di correlare l'isolamento di *M. tuberculosis* con la diagnosi clinica di TB urinaria è l'associazione, sempre presente, di piuria/ematuria e/o sintomatologia d'organo. Sarebbe pertanto buona prassi eseguire la ricerca di micobatteri nelle urine solo nei casi di sospetta tubercolosi urinaria (presenza di piuria e/o ematuria), preferendo negli altri casi i campioni respiratori o il sangue.

Feci

Occorre raccogliere una piccola quantità di feci (pari al volume di una noce) in un contenitore sterile, prestando attenzione a non contaminarlo esternamente. Non è possibile utilizzare tamponi rettali.

La ricerca dei micobatteri su campioni di feci non è raccomandata, può essere tuttavia utilizzata per la diagnosi di tubercolosi polmonare in pazienti anziani e dal 2021 l'OMS ha raccomandato le feci come nuovo tipo di campione insieme all'espettorato (espettorato o indotto), aspirato nasofaringeo o aspirato gastrico (AG) nei bambini di età inferiore a 10 anni con segni e sintomi di tubercolosi polmonare che, non riuscendo ad espettorare, deglutiscono l'escreato [6, 7].

Biopsie o prelievi operatori

I tessuti devono essere posti in contenitori sterili senza conservanti o fissativi; in nessun caso i frammenti devono essere avvolti in garza. Occorre aggiungere soluzione salina sterile in quantità sufficiente da evitare l'essiccamento dei campioni di piccole dimensioni.

Poiché si tratta di campioni ottenuti tramite procedure invasive e che rivestono un ruolo diagnostico insostituibile, è necessario attivarsi per evitare che al momento del prelievo anche la parte da inviare alla microbiologia sia posta erroneamente in fissativo, come quella destinata all'anatomia patologica.

Nel sospetto di micobatteriosi disseminata e in assenza di segni di localizzazione si può eseguire una biopsia epatica. Nel caso di sospetta tubercolosi genitale femminile il materiale di elezione è l'endometrio ottenuto mediante raschiamento.

Materiale da lesioni cutanee

La raccolta mediante tampone deve essere limitata ai casi in cui non è possibile eseguire biopsia o agoaspirato. Nelle ulcere si deve raccogliere il campione alla periferia della lesione. I materiali raccolti mediante tamponi con terreno di trasporto agarizzato non sono idonei.

Sangue e midollo emopoietico

Sangue e midollo osseo costituiscono i materiali d'elezione per la diagnosi delle forme disseminate [22]. Per il prelievo di sangue periferico occorre disinfettare la cute con le stesse modalità delle emocolture tradizionali. È possibile effettuare il prelievo direttamente nel flacone di coltura nel caso in cui si impieghino sistemi che prevedono flaconi dedicati. Si consiglia, dove possibile prelevare almeno 2 emocolture, nello stesso momento oppure entro le 24 ore. Due emocolture aumentano la resa diagnostica, in particolare in pazienti con infezione da HIV quando l'espettorato non è ottenibile [22, 23].

2.2 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE E TRASPORTO i italiani

Il trasporto al laboratorio deve essere il più rapido possibile [8].

I campioni dovrebbero essere processati entro poche ore dal momento del loro arrivo in laboratorio; la conservazione è tuttavia possibile a +4°C per un massimo di 2-3 giorni, periodo per il quale è preservata la vitalità dei micobatteri. Fanno eccezione le emocolture che vanno conservate a temperatura ambiente.

Per la spedizione si devono seguire le modalità previste dalla Circolare dei Ministero della Salute n° 3 dell'8 maggio 2003. Utili indicazioni sono anche contenute in: Spedizione sicura di campioni e materiali infetti. In: Manuale di biosicurezza in laboratorio. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. Supplemento al n° 2, vol. 31, pag. 44-49, 1995.

Idoneità dei campioni

Campioni non idonei o pervenuti in quantità insufficiente non dovrebbero essere accettati, segnalando 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.

Tabella 1 - Specifiche per la raccolta di campioni biologici per la ricerca di micobatteri

TIDO DI				
TIPO DI CAMPIONE	REQUISITI	ISTRUZIONI SPECIFICHE	NON IDONEI	
Aspirato gastrico	≥5-10 mL raccolto al mattino dopo almeno 8 ore di digiuno, per 3 giorni consecutivi	Neutralizzazione con carbonato di sodio	Campioni non neutralizzati	
Broncoaspirato, BAL,aspirato trans- tracheale	≥3 mL	Disinfezione accurata del broncoscopio		
Espettorato	3-5 mL almeno 2 campioni di cui almeno uno del mattino presto e il secondo raccolto anche a poche ore di distanza	Istruire il paziente su come espettorare	Saliva, pool di campioni	
Espettorato indotto	5-10 mL raccolto al mattino, per 3 giorni consecutivi	Specificare che si tratta di espettorato indotto		
Feci	3-5 g in contenitore senza conservanti	Non idoneo per colturale di TB, utilizzabile per determinazione molecolare se processato in modo adeguato		
Linfonodo	Linfonodo, o porzione di esso, in contenitore senza fissativo o conservante	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in fissativi, campioni inclusi in paraffina	
Liquidi cavitari: pleurico, pericardico, peritoneale	≥15 mL in provetta sterile con citrato trisodico	Per la diagnosi di pleurite tubercolare sono più indicati biopsia pleurica e espettorato indotto	zione ologi	
Liquor	≥2 mL	Clinici ito	Iliani -	
Materiale da lesione cutanea	La quantità massima possibile	Se non è possibile eseguire il prelievo con siringa o biopsia utilizzare tamponi senza terreno di trasporto (o terreno di trasporto liquido)	Tampone con terreno di trasporto agarizzato	
Materiale necrotico- ascessuale	La quantità massima possibile	Sé non è possibile eseguire il prelievo con siringa o biopsia utilizzare tamponi senza terreno di trasporto (o terreno di trasporto liquido)	Tampone con terreno di trasporto agarizzato	
Midollo emopoietico	La quantità massima possibile direttamente nel flacone da emocoltura specifico per micobatteri, o in provetta con citrato trisodico		Campione coagulato o raccolto con EDTA	
Tessuto o biopsia	≥ 1 g in contenitore senza fissativo o conservante	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in fissativi, campioni inclusi in paraffina	
Sangue mestruale	Alcuni mL raccolti in provetta con eparina al 2°-3° giorno del flusso mestruale	Preferibilmente eseguire curettage dell'endometrio	Campione coagulato	
Sangue periferico	Direttamente nel flacone da emocoltura specifico per micobatteri	Almeno 2 prelevati contemporaneamente o entro le 24 ore	Campione coagulato o raccolto con EDTA	
Urina	Prima urina del mattino (almeno 50 mL), ottenuta anche mediante catetere, per 3 giorni consecutivi	Il mitto intermedio è sconsigliato	Urina delle 24 h, urina da sacca, volumi inferiori a 50 mL	

BILIOGRAFIA 2

- Migliori G.B., Sotgiu G., Rosales-Klintz S., et al. European Union Standards for Tuberculosis care, 2017 update. Eur Respir J. in press, 2017.
- 2. Solari L., Acuna-Villaorduna C., Soto A., van der Stuyft P., Evaluation of clinical prediction rules for respiratory isolation of patients with suspected pulmonary tuberculosis, 2011, Int J Tuberc Lung Dis; 52: 595-603.
- 3. Colmenero J.D., Jimènez-Mejìas M.E., Reguera J.M., Palomino-Nicas J., Ruìz-Mesa J.D., Márquez-Rivas J., Lozano A., Pachón J., Tuberculous vertebral osteomyelitis in the new millennium: still a diagnostic and therapeutic challenge, 2004, Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 23:477-483.
- 4. Mathuram AJ, Michael JS, Turaka VP, Jasmine S, Carey R, Ramya I, et al. Mycobacterial blood culture as the only means of diagnosis of disseminated tuberculosis in advanced HIV infection. *Trop Doct.* 2018;48:100–2.
- Barr DA, Kerkhoff AD, Schutz C, Ward AM, Davies GR, Wilkinson RJ, Meintjes G. 2018. HIV-associated Mycobacterium tuberculosis bloodstream infection is underdiagnosed by single blood culture. J Clin Microbiol 56:e01914-17. https://doi.org/10.1128/JCM .01914-17
- 6. Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 7. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 5: management of tuberculosis in children and adolescents. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 8. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union Updated 2022. Stockholm: ECDC. European Reference Laboratory Network for TB (ERLTB-Net) https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/erltb-net
- 9. Alisjahbana B., van Crevel R., Danusantoso H., Gartinah T., Soemantri E.S., Nelwan R.H.H., van der Meer JW., Better patient instruction for sputum sampling can improve microscopic tuberculosis diagnosis, 2005, Int J Tuberc Lung Dis; 9:814–817
- 10. Urbanczik R., Laboratory tests focusing on sputum, 2010, Int J Tuberc Lung Dis; 14:1087-1093.
- 11. Jones F.L. Jr., The relative efficacy of spontaneous sputa, aerosol-induced sputa, and gastric-aspirates in the bacteriologic diagnosis of pulmonary tuberculosis, 1966, Dis Chest; 50:403-408.
- 12. Brown M., Varia H., Basset P., Davidson R.N., Wall R., Pasvol G., Prospective study of sputum induction, gastric washing and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients who are unable to expectorate, 2007, Clin Infect Dis; 44:1415–1420
- 13. Dickson S.J., Brent A., Davidson N.R., Wall R., Comparison of bronchoscopy and gastric washings in the investigation of smear-negative pulmonary tuberculosis, 2003, Clin Infect Dis; 37:1649–1653.

- C.L Daley, J. Iaccarino, C. Lange et al.. Treatment of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. Guideline 2020
- 15. B. A. McGrath, S. Ruane, J. McKenna and S. Thomas. Contamination of single-use bronchoscopes in critically ill patients. Anaesthesia 2017, 72, 36–41
- 16. Dania Khalid Saeed, Sadia Shakoor, Seema Irfan, Rumina Hasan, Mycobacterial contamination of bronchoscopes: Challenges and possible solutions in low resource settings, International Journal of Mycobacteriology, Volume 5, Issue 4,2016, Pages 408–411,ISSN 2212–5531, https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.08.002.
- 17. CLSI, Laboratory detection and identification of mycobacteria; CLSI guideline M48. Wayne, PA: CLSI; 2018
- 18. Barnes T.W., Olson E.J., Morgenthaler T.I., Edson R.S., Decker P.A., Ryu J.H., Low yield of microbiologic studies on pleural fluid specimens, 2005, Chest; 127: 916–921.
- 19. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 20. Berzosa M., Tsukayama T., Davies S.F., Debol S.M., Cen Y.Y., Li R., Mallery S., Endoscopic ultrasound-guided fineneedle aspiration for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis, 2010, Int J Tuberc Lung Dis; 14:578–584
- 21. Crump J.A., Reller L.B., Two decades of disseminated tuberculosis at a university medical center: the expanding role of mycobacterial blood culture, 2003, Clin Infect Dis; 37:1037-1043.
- 22. Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo D. M., Frizzera E. Micobatteriologia Clinica. II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia
- 23. Diep NT Nguyen, Trung V Nguyen, Trinh T Dao, Lam T Nguyen, Peter Horby, Kinh V Nguyen, Heiman FL Wertheim. One year experience using mycobacterial blood cultures to diagnose tuberculosis in patients with prolonged fever in Vietnam. J Infect Dev Ctries. 2014 December 15; 8(12): 1620–4. doi:10.3855/jidc.4895.
- 24. Practical implementation of LF-LAM for detection of active TB in people living with HIV.https://stoptb.org/wg/GLI/gat.asp
- 25. FIND Poin t-of-care TB LAM tests FIND (finddx.org)
- 26. David Branigan. Pipeline report 2022. Tuberculosis Diagnostics https://www.treatmentactiongroup.org/wp-content/uploads/2022/11/pipeline_TB_diagnostics_2022.pdf

3. Annesso 2 - ESAME MICROSCOPICO

L'esame microscopico è un test diagnostico rapido ed economico per evidenziare la presenza di micobatteri in un campione biologico. Il limite principale del metodo è rappresentato dalla scarsa sensibilità (25-75% rispetto all'esame colturale), dovuta al fatto che è necessaria la presenza di un numero elevato di micobatteri nel campione per la positività (circa 10⁴ bacilli/mL). Inoltre, la microscopia è dotata di scarsa specificità, dal momento che le proprietà tintoriali sono comuni anche ad altri microrganismi, non consente di identificare la specie micobatterica e non fornisce informazioni sulla vitalità dei microrganismi. Nonostante non sia più raccomandato come test iniziale per la diagnosi di TB, rimane utilizzato per il monitoraggio della terapia in associazione alla coltura e nell'identificazione di casi altamente bacilliferi.

I micobatteri sono microrganismi difficilmente colorabili a causa della presenza dell'elevato contenuto lipidico della parete batterica. Questa caratteristica fa sì che, diversamente dalla grande maggioranza dei batteri, i micobatteri si colorino poco o per nulla con la colorazione di Gram, mentre sono in grado di legare stabilmente alcuni coloranti in soluzione fenolica, trattenendoli anche se sottoposti a un trattamento di decolorazione molto energico eseguito con una miscela di acido forte e alcol. Tale proprietà è conosciuta come alcol-acido-resistenza.

È possibile effettuare la ricerca microscopica di micobatteri 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 decontaminazione e concentrazione mediante centrifugazione, è sconsigliato, dal momento che riduce ulteriormente la già bassa sensibilità del test. La colorazione per la ricerca di bacilli alcol-acido-resistenti (BAAR), oltre che sui campioni clinici di soggetti con sospetta infezione micobatterica, deve essere eseguita su colture con presenza di crescita per confermare la presenza di micobatteri.

Due tipi di colorazione sono comunemente impiegate per rilevare BAAR: la colorazione con carbolfucsina e la colorazione con fluorocromi (auramina, auramina-rodamina). A sua volta, la colorazione con carbolfucsina può essere eseguita con il metodo Ziehl-Neelsen, in cui i vetrini sono scaldati durante la colorazione, o con il metodo a freddo Kinyoun. Le colorazioni con carbolfucsina permettono di evidenziare in maniera ottimale le caratteristiche morfologiche dei microrganismi e sono caratterizzate da maggiore specificità rispetto a quelle con fluorocromi, in confronto alle quali, tuttavia, richiedono un tempo di osservazione maggiore. La lettura dei preparati con fluorocromi richiede un microscopio a fluorescenza e una maggior esperienza da parte dell'operatore, ma comporta una sensibilità maggiore dato che, utilizzando ingrandimenti minori, permette, a parità di tempo, l'osservazione di aree più vaste del preparato. La microscopia a LED ha sostituito la microscopia a fluorescenza per i costi inferiori a parità di risoluzione [1, 2].

3.1 ESECUZIONE DELLO STRISCIO:

Tutte le procedure vanno eseguite in cappa di sicurezza di classe II. La microscopia può essere eseguita anche direttamente da campione biologico a seconda delle possibilità diagnostiche del laboratorio. In questo caso è bene selezionare la parte del campione muco-purulenta ed evitare la parte salivare.

· utilizzare vetrini ben sgrassati, opportunamente contrassegnati con l'identificativo del campione;

• trasferire una porzione del campione sul vetrino utilizzando un'ansa o una pipetta. Distribuire il materiale su una superficie di approssimativamente $1,5 \times 2$ cm, facendo attenzione che il preparato non risulti eccessivamente spesso o sottile (vedi fig. 1):

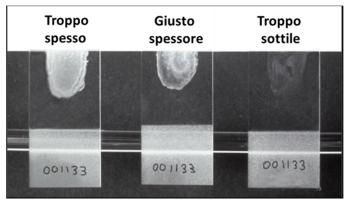


Fig. 1. Preparazione dello striscio

- per i campioni concentrati (tramite centrifugazione per 15 minuti a 3000 \times g oppure mediante citocentrifugazione) utilizzare una o due gocce di sedimento;
- qualora si parta da campioni clinici non concentrati occorre selezionare il materiale delle aree necrotico-purulente;

microbiologi

- · lasciare asciugare all'aria;
- · fissare i vetrini utilizzare mediante piastra riscaldante (65°-75°C) per almeno due ore.

3.2 COLORAZIONE

Sono commercialmente disponibili e ampiamente usati i coloratori automatici, che consentono di processare un elevato numero di campioni. Tali apparati richiedono reagenti dedicati e sono in grado di realizzare sia la colorazione con carbolfucsina che con fluorocromi. Di seguito sono comunque descritte le procedure manuali.

3.2.1 COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELSEN (CARBOLFUCSINA A CALDO)

Tutte le operazioni vanno eseguite sotto cappa chimica.

Procedimento:

- coprire il vetrino con carbolfucsina di *Ziehl*. Scaldare lentamente, fino alla formazione dei primi vapori, passando sotto il vetrino la fiamma di un batuffolo di cotone impregnato di alcol. Colorare per 5 minuti aggiungendo, se necessario, nuovo colorante in modo che il preparato rimanga costantemente coperto. NB. I vapori che si sviluppano sono tossici;
- · lavare con acqua di fonte;
- · decolorare con la miscela acido-alcol effettuando due o più passaggi della durata di 30 secondi, fino a guando nel liquido di lavaggio non vi è più traccia di colorante;
- sciacquare il vetrino con acqua di fonte;
- · colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi;
- · lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica viene effettuata con obbiettivo 100x, ad immersione. I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore azzurro-blu.

3.2.2. COLORAZIONE DI KINYOUN (CARBOLFUCSINA A FREDDO)

Tutte le operazioni vanno eseguite sotto cappa chimica.

Procedimento:

- coprire il vetrino con carbolfucsina di Kinyoun. Colorare per 5 minuti;
- · lavare con acqua di fonte;
- · 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 sia più traccia di colorante;
- lavare con acqua di fonte;
- · colorare con blu di metilene per almeno 30 secondi;
- · lavare con acqua di fonte e scolare i vetrini;
- · asciugare all'aria.

L'osservazione microscopica viene effettuata con obbiettivo 100x, ad immersione. I microrganismi alcol-acido-resistenti appaiono di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore azzurro-blu.

3.2.3. COLORÁZIONE FLUOROCROMICA CON AURAMINA E SUE VARIANTI

Procedimento:

- · coprire il vetrino con auramina, colorare per 15 minuti senza riscaldare;
- lavare con acqua di fonte;
- decolorare con la miscela acido-alcol per 2 minuti;
- · lavare con acqua di fonte;
- · 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.

L'osservazione microscopica va effettuata entro 24 ore (la fluorescenza decade nel tempo); in caso di lettura ritardata conservare i vetrini al buio alla temperatura di 2-4 °C.

L'osservazione dei vetrini viene effettuata utilizzando un microscopio a fluorescenza dotato di lampada a vapori di mercurio o un microscopio a LED; si utilizzano obbiettivi da 20x o 40x. 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 0 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. Nei casi dubbi è possibile sovracolorare con carbolfucsina, senza previa decolorazione, un preparato già colorato con fluorocromi.

3.3. OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

Si suggerisce di esaminare il vetrino osservando un numero adequato di campi microscopici prima di considerarlo negativo (circa 80 campi usando la microscopia a fluorescenza e 300 campi usando la microscopia ottica a immersione). Il metodo di lettura deve garantire l'osservazione di una parte significativa del campione eseguendo una serie di passaggi lungo gli assi maggiore e minore del preparato [1]. I micobatteri tubercolari appaiono come bastoncelli lunghi e sottili (2-8 x 0,5µm), talvolta ricurvi, isolati o più spesso riuniti in gruppetti. Talvolta possono presentare un aspetto bandeggiato con zone scarsamente colorate o del tutto prive di colore. Alcune specie di micobatteri non tubercolari hanno un aspetto microscopico pleomorfo che può andare dalle forme coccoidi a quelle allungate. Raramente possono osservarsi micobatteri ramificati, più spesso tale morfologia è riferibile a presenza di Nocardia sp. Qualora, in preparati allestiti da colture in terreno liquido, si osservino fasci serpentiformi alcolacido-resistenti formati da numerosi bacilli allineati in lunghe file parallele (cordoni), la presenza di *M. tuberculosis* è da ritenersi altamente probabile; un aspetto simile può essere eventualmente osservato anche in presenza di altri micobatteri, quali Mycobacterium chelonae, Mycobacterium abscessus o Mycobacterium ulcerans.

3.4. MICROSCOPIA A LED

Evidenze sperimentali promuovono la microscopia a LED come sostituto di entrambi i metodi convenzionali microscopia a fluorescenza e microscopia di preparati colorati con carbolfucsina. La microscopia a LED facilita l'identificazione dei BAAR, può essere utilizzato con la colorazione con auramina, è conveniente (la durata della lampada è superiore a 10.000 ore), ha bassi requisiti di alimentazione e può essere facilmente introdotto nei centri di microscopia, incluse strutture periferiche. Inoltre, l'intensità della luce può essere facilmente regolata.

Poiché la microscopia basata su LED è stata riconosciuta come un importante sviluppo nella fluorescenza diretta microscopia, l'OMS ha raccomandato che sostituisca la microscopia a fluorescenza convenzionale e che venga utilizzata come alternativa alla microscopia *Ziehl-Neelsen* convenzionale nei laboratori.

3.5. REFERTAZIONE

L'esame microscopico ha un tempo di refertazione massimo di 24 ore lavorative a partire dall'arrivo del campione in laboratorio. In assenza di diagnosi nota di TB, la positività microscopica (confermata da test molecolare per MTB) deve essere comunicata tempestivamente al clinico per permettere l'immediato isolamento del paziente, la cui contagiosità è direttamente proporzionale al numero di bacilli evidenziati. L'esame negativo va refertato come: "Negativo per bacilli alcol-acido-resistenti"; quello positivo deve essere refertato, in base al tipo di colorazione utilizzata e al numero di bacilli alcolacido resistenti presenti nei campi microscopici osservati a diversi ingrandimenti, come indicato nello schema riportato in tabella 1.

T I II 1 0 1		•	. [4]
Lahalla I Schama d	rotortaziono doll'oc	ama microca	CONICO III
Tabella 1. Schema d	TETEL LOZIONE UELLES	ame milli ust	.00100111
			[.]

BAAR OSSER	REFERTO		
CARBOLFUCSINA	AURAMINA	AURAMINA	
Obbiettivo 100x	Obbiettivo 20x	Obbiettivo 40x	
0	0	0	Negativo
1-2 per 300 campi	1-2 per 30 campi	1-2 per 70 campi	Rari BAAR
1-9 per 100 campi	1-9 per 10 campi	2-18 per 50 campi	Positivo +
1-9 per 10 campi	1-9 per campo	4-36 per 10 campi	Positivo ++
1-9 per campo	10-90 per campo	4-36 per campo	Positivo +++
>9 per campo	>90 per campo	>36 per campo	Positivo ++++

BIBLIOGRAFIA 3

- 1. Smear microscopy. In: ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2018.
- Martin I., Pfyffer GE., Parrish N., Mycobacterium: general characteristics, isolation, and staining procedures, in: Carroll K.C., Pfaller MA., Landry M.L., McAdam A.J., Patel R., Richter S.S., Warnock D.W., Manual of clinical microbiology, 12th edition, 2019, ASM Press, Washington DC; 558–575.

clinici italiani

Ente del Terzo Settore

4. Annesso 3 - DECONTAMINAZIONE E COLTURA

Se comparata a quella di altri batteri, la crescita dei micobatteri è lenta e la comparsa delle colonie richiede, in condizioni ottimali di incubazione, tempi che variano, a seconda delle specie, da pochi giorni a varie settimane.

I campioni biologici da inoculare in coltura si suddividono in:

- contaminati dalla flora residente, quali ad esempio espettorato, espettorato indotto, aspirato gastrico, tampone laringeo, lavaggio bronco-alveolare, aspirato bronchiale, urine, feci, prelievi autoptici, sangue mestruale;
- · non contaminati perché provenienti da siti sterili, quali ad esempio sangue, midollo osseo, liquidi cavitari, liquido cefalo-rachidiano, urine ottenute mediante puntura sovrapubica, aspirati da puntura trans-tracheale.

I campioni contaminati da flora residente richiedono un processo di decontaminazione, omogeneizzazione e concentrazione. Per i campioni sterili è sufficiente il processo di concentrazione, a meno che il clinico non segnali il sospetto di una concomitante infezione da altri batteri.

4.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni provenienti dalle basse vie respiratorie non richiedono trattamenti diversi dalla normale decontaminazione; altri tipi di campione necessitano invece di procedure particolari [1-3]. clinici italiani

Prelievi bioptici

Occorre ridurli in frammenti minuti con forbici o bisturi sterili o tissue grinder, quindi sospenderli in soluzione fisiologica e omogeneizzarli utilizzando mortaio e pestello sterili, prima di procedere all'esecuzione di esame microscopico e colturale. Nei casi in cui esista la possibilità di un'infezione da germi diversi dai micobatteri (su indicazione clinica o se la richiesta include anche la ricerca dei germi comuni) può essere utile esequire in doppio l'esame colturale, sia prima che dopo decontaminazione.

Per i pazienti pediatrici non in grado di espettorare si può ricorrere all'utilizzo delle feci, per il test molecolare. Il materiale deve essere opportunamente diluito e lasciato sedimentare. Per il test si usa il sopranatante [5]. Per l'esame colturale, l'utilizzo delle feci è fortemente sconsigliato.

Aspirato gastrico

È necessario, prima della decontaminazione, neutralizzare il pH aggiungendo al campione carbonato di sodio (qualora non sia già stato fatto al momento del prelievo); in alternativa è possibile centrifugare il campione, risospendendo il sedimento in 5-10 mL di tampone fosfato 0,067 M a pH 6,8.

Liquidi cavitari

È sufficiente concentrare per centrifugazione (3000 x g per 15 minuti) e quindi decantare ed eseguire lo striscio microscopico e la semina direttamente dal sedimento.

Campioni raccolti con tampone

Porre il tampone in una provetta contenente 2-3 mL di soluzione fisiologica, agitare al vortex per almeno 30 secondi, recuperare il tampone e scartarlo dopo averlo premuto contro la parete interna della provetta. Concentrare mediante centrifugazione (3000 x g

per 15 minuti) la sospensione così ottenuta e seminare il sedimento sia direttamente che previa decontaminazione.

Urine

Il campione va centrifugato a 3000 x g per 15 minuti. Dopo decantazione e risospensione del sedimento in 5 mL di soluzione salina si procede alla decontaminazione.

4.2. DECONTAMINAZIONE

La decontaminazione ha lo scopo di abbattere la carica microbica contaminante ai più bassi livelli possibili affinché non interferisca con la crescita dei micobatteri. La decontaminazione può influire sulla vitalità degli stessi micobatteri, perciò è fondamentale il rispetto dei tempi di contatto tra campione e decontaminante [1, 2, 3].

NALC-IDRATO DI SODIO

È il metodo più adottato e utilizza come agente fluidificante N-acetil-L-cisteina (NALC) e come decontaminante idrato di sodio (NaOH) alla concentrazione del 2% [3].

Esistono prodotti commerciali pronti all'uso che forniscono tutti i reagenti per la decontaminazione secondo la procedura NALC-NaOH. Per i dettagli operativi dei singoli kit si rimanda alle rispettive istruzioni del produttore.

Nell'attività di routine è necessario tenere sotto controllo la percentuale di campioni contaminati. La percentuale di contaminazione deve rimanere compresa fra il 3% e il 5%; una percentuale inferiore al 3% denota un processo di decontaminazione troppo energico, una percentuale superiore al 5% è indice di una decontaminazione troppo debole o di una incompleta fluidificazione. Nei terreni liquidi, la cui composizione è estremamente ricca, può risultare difficile rispettare il limite del 5% (non deve superare comunque il 7-8% nei materiali respiratori). È anche possibile ridecontaminare il sedimento di una coltura liquida contaminata con pari volume di NaOH al 4% e successivamente procedere a un nuovo inoculo.

4.3. ESAME COLTURALE

Gli attuali standard internazionali raccomandano l'uso di terreni liquidi e solidi (per l'isolamento dei micobatteri da campioni biologici) [1, 2, 3, 4, 6].

La coltura in terreno solido può essere eseguita a partire da qualsiasi tipo di materiale biologico. In caso di sospetto di NTM o di infezione mista, valutare la possibilità di incubazione a temperature diverse.

4.3.1. COLTURA IN TERRENO SOLIDO

I terreni solidi più utilizzati sono a base di uova con verde malachite (Löwenstein-Jensen) e agarizzati (Middlebrook 7H10 e 7H11).

Dopo l'omogeneizzazione e l'eventuale decontaminazione, i campioni vanno inoculati nelle provette di terreno solido, in ragione di 0,10-0,25 mL (2-5 gocce). Le provette devono essere incubate in posizione inclinata, in modo che il materiale possa ricoprire per intero tutta la superficie del terreno a becco di clarino, con il tappo lasciato allentato per permettere l'evaporazione della parte liquida dell'inoculo. Dopo qualche giorno, quando il terreno sarà asciutto, occorre serrare il tappo ed è possibile proseguire l'incubazione in posizione verticale.

L'incubazione deve essere protratta per almeno 8 settimane; l'incubazione fino a 12 settimane può rendersi necessaria per permettere la crescita anche dei ceppi disgonici o a crescita particolarmente lenta.

Si raccomanda che tutti i terreni solidi siano esaminati settimanalmente per verificare se vi sia stata crescita di micobatteri e di eventuali contaminanti. Dalle colonie eventualmente cresciute sulla superficie dei terreni di coltura deve essere allestito un vetrino per differenziare i bacilli alcol-acido-resistenti dagli eventuali contaminanti.

4.3.2. COLTURA IN TERRENO LIQUIDO

Esistono in commercio vari tipi di terreni liquidi per micobatteri che prevedono l'impiego di apparecchi automatici per l'incubazione e la lettura. Il rilevamento di prodotti del metabolismo microbico con metodiche sensibili e automatizzate abbrevia in maniera significativa i tempi di crescita dei micobatteri nei campioni clinici.

Il sistema automatico BACTEC ™ MGIT ™ 960 TB System (Becton Dickinson, US) è di gran lunga il più diffuso in Italia e nel mondo. Il terreno è contenuto in provette alle quali devono essere aggiunti un supplemento, costituito da una miscela di antibiotici (PANTA) che lo rende selettivo e un arricchimento (OADC). Una volta inoculate con 0,5 mL di campione decontaminato o, per i materiali provenienti da siti sterili, semplicemente concentrato, le provette vengono caricate nello strumento, dove vengono incubate a una temperatura di 37 °C per 6-8 settimane o fino alla comparsa di positività. Sulle provette che lo strumento segnala come positive deve essere eseguito un preparato microscopico, atto a verificare la presenza o l'assenza di BAAR. Quando lo strumento segnala la scadenza del periodo di incubazione è buona regola, prima di eliminare le provette considerate negative, esaminarle visivamente per individuare l'eventuale presenza di torbidità o di granuli che potrebbero indicare una crescita non rilevata dallo strumento (condizione particolarmente frequente per *M. xenopi* [7]. In quest'ultimo caso occorre eseguire un preparato microscopico atto a verificare la presenza di bacilli alcolacido-resistenti.

La percentuale di contaminazioni in terreno liquido è solitamente non inferiore al 6-8% [8]. Per i dettagli operativi del sistema MGIT o di altri sistemi eventualmente usati si rimanda alle istruzioni del produttore.

4.4. EMOCOLTURA

Poiché i micobatteri quando sono presenti nel sangue lo sono in bassa carica e in maniera intermittente, il sangue non può essere considerato il materiale di elezione per diagnosticare un'infezione da micobatteri. È perciò importante che la richiesta di emocoltura sia basata su fondati sospetti clinici. La sepsi da micobatteri tubercolari è comunemente associata a tubercolosi miliare, mentre le sepsi da micobatteri non tubercolari sono più frequenti in corso di AIDS o comunque in presenza di grave compromissione del sistema immunitario. In tali pazienti le specie più frequentemente isolate appartengono al *Mycobacterium avium* complex.

Sangue e midollo osseo costituiscono i materiali d'elezione per la diagnosi delle forme disseminate. Per il prelievo di sangue periferico occorre disinfettare la cute con le stesse modalità delle emocolture tradizionali. È possibile effettuare il prelievo direttamente nel flacone di coltura nel caso in cui si impieghino sistemi che prevedono flaconi dedicati. Si consiglia, dove possibile prelevare almeno 2 emocolture, nello stesso momento oppure entro le 24 ore. Due emocolture aumentano la resa diagnostica, in particolare in pazienti con infezione da HIV quando l'espettorato non è ottenibile [9, 10, 11]. Oltre al classico

prelievo ematico mediante puntura venosa può essere praticata una mielocoltura e, nel caso di sospetta tubercolosi dell'apparato genitale femminile, la coltura del sangue mestruale

4.5. CONTROLLO DI QUALITÀ

È importante controllare tutti i lotti di terreno, siano essi preparati in laboratorio o acquistati dal commercio; questi ultimi infatti, pur essendo sottoposti a controlli da parte del produttore, potrebbero non essere stati trasportati e conservati in modo ottimale. Terreni di ogni nuovo lotto dovrebbero essere inoculati con una sospensione (torbidità 1 McFarland diluita 1/100) di colture fresche di *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177), *Mycobacterium kansasii* (ATCC 12478) e *Mycobacterium fortuitum* (ATCC 6841). Un controllo deve essere poi eseguito con un ceppo di *Escherichia coli* (ATCC 25922) per verificare la presenza di inibizione, almeno parziale, dovuta alla presenza di verde malachite o alla miscela di antibiotici. Tutti i terreni così inoculati vanno incubati con le stesse modalità adottate per i campioni clinici.

Per tenere sotto controllo le contaminazioni, in ogni seduta lavorativa può essere incluso un controllo negativo costituito da acqua sterile. Il controllo deve essere processato insieme ai campioni clinici e inoculato negli stessi terreni. Il campione deve rimanere negativo fino al termine del protocollo di incubazione. Nel caso di comparsa di positività per bacilli alcol-acido resistenti devono essere invalidati tutti i risultati di quel *batch* di campioni. In tal caso, come anche in presenza di contaminazione da flora microbica aspecifica, devono essere introdotte o verificate le seguenti misure correttive [1, 3]:

- · revisione approfondita di tutte le procedure; Clinici italiani
- · controllo della sterilità di tutti i reagenti o preparazione di nuovi reagenti;
- · disinfezione delle cappe biologiche di sicurezza. Le del Terzo Settore

I laboratori che eseguono la diagnostica micobatteriologica sono tenuti a partecipare a un programma esterno di qualità per ogni aspetto della diagnostica erogata [12]. Fra i programmi di *proficiency* disponibili in commercio, i seguenti valutano le performance delle metodiche impiegate per la coltura dei micobatteri:

- Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), http://www.instand-ev.de, spedisce 10 campioni all'anno recapitati in due invii. I tempi di risposta sono abbastanza ristretti (un mese) e richiedono la sola detection (positivo o negativo), mentre l'identificazione è opzionale;
- · UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (NEQAS), London (UK), http://www.ukneqasmicro.org.uk, è distribuito in Italia da Oxoid. Il programma NEQAS invia 4 campioni 3 volte l'anno, è necessario identificare il micobatterio isolato e segnalare il tempo di crescita; la *deadline* per l'invio delle risposte è di circa 3 mesi.

4.6. CROSS-CONTAMINAZIONI

Le cross-contaminazioni di laboratorio si verificano quando, durante la processazione, una coltura viene contaminata da micobatteri provenienti da un campione (positivo) diverso da quello inoculato.

Quando si sospetti la presenza di una contaminazione crociata è raccomandato il ricorso a tecniche di tipizzazione molecolare mediante WGS che sono in grado di accertare se i ceppi incriminati siano o meno identici (vedi *Annesso 8*).

I seguenti riscontri laboratoristici debbono costituire un serio campanello di allarme per far ipotizzare la presenza di contaminazione crociata:

- aumentata incidenza di colture positive da campioni con esame microscopico negativo;
- debole positività colturale di uno o più campioni microscopico-negativi, provenienti da pazienti privi di fondato sospetto clinico, processati in una seduta comprendente un campione fortemente positivo.

4.7. REFERTAZIONE

In caso di negatività refertare: "Negativa la coltura di micobatteri".

In caso di positività refertare: "Positiva la crescita di bacilli alcol-acido-resistenti. Identificazione in corso".

La refertazione delle colture positive deve essere fatta non appena si rileva crescita sul primo dei terreni seminati, di solito il terreno liquido. L'incubazione dell'altro terreno (solitamente quello solido) va comunque prolungata fino al momento della comparsa di positività o fino al termine del periodo di incubazione.

La contaminazione di una coltura deve essere segnalata quanto prima al clinico, per l'eventuale invio di un nuovo campione.



BIBLIOGRAFIA 4

- 1. Chiaradonna P., Tronci M. Decontaminazione e coltura. In: Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo D. M., Frizzera E. Micobatteriologia Clinica. II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia.
- 2. CLSI, Laboratory detection and identification of mycobacteria; CLSI guideline M48. Wayne, PA: CLSI; 2018.
- 3. ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2018.
- 4. European Reference Laboratory Network for TB (ERLTB-Net) https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/erltb-net
- 5. Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 6. Pfyffer G.E., Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr., Mycobacterium: general characteristics, isolation, and staining procedures, in: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Yolken R.H. Eds., Manual of clinical microbiology, 2003, ASM Press, Washington DC; 532-559.
- 7. Piersimoni C, Nista D, Bornigia S, Gherardi G. Unreliable detection of *Mycobacterium xenopi* by the nonradiometric Bactec MGIT 960 culture system. J Clin Microbiol. 2009 Mar;47(3):804-6. doi: 10.1128/JCM.01444-08. Epub 2009 Jan 14. PMID: 19144802; PMCID: PMC2650918.
- 8. Tortoli E., Cichero P., Piersimoni C., Simonetti MT., Gesu G., Nista D., Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study, 1999, J Clin Microbiol; 37:3578–3582.
- 9. Mathuram AJ, Michael JS, Turaka VP, Jasmine S, Carey R, Ramya I, et al. Mycobacterial blood culture as the only means of diagnosis of disseminated tuberculosis in advanced HIV infection. *Trop Doct.* 2018;48:100–2.
- 10. Barr DA, Kerkhoff AD, Schutz C, Ward AM, Davies GR, Wilkinson RJ, Meintjes G. 2018. HIV-associated Mycobacterium tuberculosis bloodstream infection is underdiagnosed by single blood culture. J Clin Microbiol 56:e01914-17. https://doi.org/10.1128/JCM.01914-17
- 11. Diep NT Nguyen, Trung V Nguyen, Trinh T Dao, Lam T Nguyen, Peter Horby, Kinh V Nguyen, Heiman FL Wertheim. One year experience using mycobacterial blood cultures to diagnose tuberculosis in patients with prolonged fever in Vietnam. J Infect Dev Ctries. 2014 December 15; 8(12): 1620–4. doi:10.3855/jidc.4895.
- 12. Nikolayevskyy V, Hillemann D, Richter E, Ahmed N, van der Werf MJ, Kodmon C, Drobniewski F, Ruesch-Gerdes S; ERLTB-Net Network. External Quality Assessment for Tuberculosis Diagnosis and Drug Resistance in the European Union: A Five Year Multicentre Implementation Study. PLoS One. 2016; 11:e0152926.

5. Annesso 4 - RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI MTB DA CAMPIONI CLINICI MEDIANTE AMPLIFICAZIONE GENICA

La necessità di disporre di un test rapido per la diagnosi di tubercolosi ha portato allo sviluppo delle tecniche di amplificazione mirate alla ricerca di MTB direttamente nei campioni clinici, sia respiratori che non. I recenti progressi nella comprensione delle basi molecolari implicate nella farmaco-resistenza e la possibilità di rilevare il DNA dei bacilli tubercolari direttamente dai campioni clinici rendono l'identificazione molecolare delle mutazioni associate alla farmaco-resistenza un mezzo utile per la determinazione della resistenza ai farmaci in tempi rapidi.

Le recenti linee guida dell'OMS sottolineano l'importanza e incoraggiano l'utilizzo di questi test [1, 2, 3, 4]. Nella diagnosi di tubercolosi e tubercolosi resistente ai farmaci (DR-TB). Quelli raccomandati dall'OMS hanno una buona sensibilità e specificità per il rilevamento di MTB e la maggior parte, ma non tutti, sono in grado di rilevare anche la resistenza a RIF (RR-TB) o sia a rifampicina (RIF) che a isoniazide (INH), facilitando il rilevamento della monoresistenza a ciascuno di questi principali farmaci antitubercolari di prima linea, così come la resistenza combinata (ovvero tubercolosi multiresistente (MDR-TB)) [3, 4, 5].

Quelli raccomandati dall'OMS e attualmente commercializzati in Italia sono indicati di seguito (Tabella 1). Oltre ai test molecolari raccomandati dall'OMS ve ne sono altri approvati come IVD nel mercato europeo. Test basati sulla tecnologia target NGS sono disponibili in Europa e in Italia e sono in corso di valutazione presso l'OMS.

Tabella 1 - Test molecolari raccomandati dall'OMS per la diagnosi rapida di TB e DR-TB

rescribe per la diagnost replación la				
Test	Produttore	Descrizione	Resistenza rilevata	
Test diagnostico primario per la diagnosi di TB e la rilevazione di resistenza ai farmaci				
Xpert MTB/RIF Ultra	Cepheid, Sunnyvale, CA, USA	NAAT automatizzato	RIF	
Truenat MTB o MTB Plus per rilevare MTB e Truenat MTB- RIF-DX per TB-DR	Molbio Diagnostics, Goa, India	NAAT automatizzato	RIF	
RealTime MTB per rilevare MTB e Realtime MTB RIF/INH per TB- DR	Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA	NAAT automatizzato	RIF, INH	
BD MAX MDR-TB	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA	NAAT automatizzato	RIF, INH	
FluoroType MTB per rilevare MTB e FluoroType MTBDR per TB-DR	Bruker/HAIN Lifescience, Nehren, Germany	NAAT automatizzato	RIF, INH	
Cobas MTB per rilevare MTB e cobas MTB RIF/INH per TB-DR	Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA	NAAT automatizzato	RIF, INH	
Test diagnostico successivo per la rilevazione di resistenza ai farmaci				
Xpert MTB/XDR	Cepheid, Sunnyvale,	NAAT	INH, FQ,	

	CA, USA	automatizzato	ETO, AMK
GenoType MTBDR <i>plus</i>	Bruker/HAIN Lifescience, Nehren, Germany	LPA	RIF, INH, ETO
Genoscholar NTM+MDRTB Detection kit	NIPRO Corporation, Osaka, Japan	LPA	RIF, INH
GenoType MTBDR <i>sl</i>	Bruker/HAIN Lifescience, Nehren, Germany	LPA	FQ, AMK
Genoscholar PZA-TB	NIPRO Corporation, Osaka, Japan	LPA	PZA

5.1. TEST MOLECOLARI RACCOMANDATI DALL'OMS PER LA DIAGNOSI RAPIDA DI TB E DR-TB

5.1.1. XPERT MTB/RIF Ultra (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)

Si tratta di una piattaforma completamente automatizzata in cui l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione mediante emi-nested RT-PCR si realizzano all'interno di una cartuccia monouso. Dal punto di vista pratico, il sistema Xpert ha alcuni vantaggi rispetto ai test molecolari convenzionali: a) è facile da eseguire; b) può essere utilizzato ondemand piuttosto che in batch; c) necessita di scarso training; d) richiede requisiti minimi di sicurezza; e) non è incline alle cross-contaminazioni.

Il test Xpert MTB/RIF Ultra (Ultra) permette il rilevamento, semiquantitativo, di MTB e il contemporaneo evidenziamento di eventuali mutazioni associate a rifampicino-resistenza. I Target utilizzati sono, oltre a *rpo*B, le sequenze di inserzione IS6110 e IS1081. Il test utilizza una chimica rinnovata e una camera di reazione più grande (larger DNA reaction tube) rispetto alla versione precedente. Questi cambiamenti hanno permesso al saggio di rilevare fino a 16 CFU/ml, comparate alle 114-CFU/ml della versione precedente. Anche l'insufficiente specificità nel rilevamento della resistenza alla rifampicina è stata migliorata in quanto le mutazioni vengono adesso rilevate in base alle curve di melting. In caso di positività, i risultati sono riportati in modo semiquantitativo (high, medium, low, very low, trace). Il significato della positività in "tracce" (trace) è associato a una carica molto bassa che non permette di rilevare la resistenza alla rifampicina. I criteri di interpretazione per questa categoria sono legati alla tipologia del materiale e del paziente.

Nel 2021 è stata introdotta una nuova cartuccia, Xpert MTB/XDR, per il rilevamento delle resistenze a: isoniazide, mediante il rilievo delle mutazioni nei geni *kat*G e *fab*G1, nelle regioni intergeniche oxyR-ahpC e nel promotore di *inh*A promoter; ethionamide (ETH) associata a mutazioni nel promotore di *inh*A; fluoroquinoloni (FLQ) associate a mutazioni nei geni *gyr*A and *gyr*B (regioni QRDR); agli iniettabili di seconda linea (SLID) associate alle mutazioni nel gene *rrs* e nel promotore del gene *eis*.

5.1.2. Truenat MTB e MTB-RIF DX (Molbio Diagnostics, Goa, India)

I test Truenat MTB, MTB Plus e MTB-RIF Dx sono stati sviluppati in India e sono stati raccomandati dall'OMS allo stesso modo del sistema Xpert. MTB and MTB Plus sono test iniziali per la diagnosi di TB, mentre MTB-RIF Dx è utilizzato come test reflex per l'identificazione della rifampicino-resistenza, per quei campioni risultati positivi al test iniziale. I test Truenat sono basati su una real time PCR automatizzata per l'identificazione di *M. tuberculosis* e della resistenza alla RIF su espettorato, con minima manualità da parte dell'utente. I saggi usano dispositivi a batteria per l'estrazione e l'amplificazione del DNA, possono essere utilizzati in laboratori periferici con infrastrutture minime e necessitano di formazione minima.

5.1.3. RealTime MTB e RealTime MTB RIF/INH (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA)

Sono due test molecolari real-time per la tubercolosi, uno per il rilevamento del *Mycobacterium tuberculosis* (RealTime MTB test) e uno per il rilevamento della resistenza sia alla rifampicina che all'isoniazide (RealTime MTB RIF/INH). Per il rilevamento della tubercolosi viene utilizzato come target sia l'elemento genetico IS6110 che il gene *pab*. Il test di resistenza alla rifampicina e all'isoniazide utilizza otto sonde marcate con colorante per rilevare le varianti nelle regioni di determinazione della resistenza alla rifampicina (RRDR) del gene *rpo*B e quattro sonde per rilevare resistenza all'isoniazide, con due sonde ciascuna per i geni *kat*G e *inh*A. Limite di rilevazione (LoD) riferito: 17 cfu/mL per il test RealTime MTB e di 60 colonie formanti unità (ufc)/mL per il dosaggio RealTime RIF/INH. Il test viene eseguito su piattaforma m2000, m2000sp per l'estrazione automatizzata del DNA e m2000rt per la PCR in real-time. Sistema in batch, adatto a grandi numeri (fino a 94 campioni).

5.1.4. BD MAX™ MDR-TB Becton Dickinson (BD)

Si tratta di una PCR multiplex real-time, automatizzata, per la rilevazione di MTB e resistenza sia alla RIF che all'INH. Il test viene eseguito su una piattaforma che utilizza il rilevamento a cinque colori. Per il rilevamento di MTB, questo test utilizza come target gli elementi genomici multicopia IS6110 e IS1081, nonché un bersaglio genomico a copia singola. Per il rilevamento della resistenza alla RIF (RR-DR), il test utilizza i codoni 507-533 Escherichia coli nomenclatura (nomenclatura 426-452 MTB) del gene *rpo*B; per il rilevamento della resistenza a isoniazide, il test valuta sia la regione del promotore *inh*A che il codone 315 del gene *kat*G. Il LoD riportato dall'azienda è di 0,5 cfu/mL per il rilevamento di MTB e di 6 cfu/mL per il rilevamento delle resistenze. Il test viene eseguito su DNA estratto automaticamente e la PCR eseguita in real time.

5.1.5. FluoroType MTB e FluoroType MTBDR (Bruker/HAIN Lifescience, Nehren, Germany)

Si tratta di due NAATs in *RealTime*: il FluoroType® MTB, che rileva MTB, e il FluoroType MTBDR, che rileva MTB, rifampicina e isoniazide resistenza.

I geni bersaglio sono *rpo*B per il rilevamento della tubercolosi e della resistenza alla rifampicina e del promotore *inh*A e del gene *kat*G da rilevare resistenza all'isoniazide. Il LoD riportato dall'azienda è di 15 cfu/mL per FluoroType MTB test e 20 cfu/mL per il test FluoroType MTBDR. Per l'estrazione del DNA, sono disponibili un sistema manuale (FluoroLyse) e uno automatizzato (GenoXtract). Le piattaforme utilizzate per l'amplificazione e il rilevamento sono FluoroCycler® per il test MTB e FluoroCycler XT per il saggio MTBDR.

5.1.6. Cobas® MTB e cobas® MTBRIF/INH (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA)

Due NAATs: test cobas® MTB per rilevare Mtb e cobas® MTBRIF/INH per rilevare la resistenza ai farmaci (rifampicina e isoniazide). Il test MTB cobas rileva sia l'RNA ribosomiale 16S (rRNA) che i geni esx come geni bersaglio per il rilevamento di MTB. Il LoD riportato dall'azienda per questo test è di 7,6–8,8 cfu/mL. Viene rilevata resistenza alla rifampicina utilizzando RR-DR e resistenza all'isoniazide utilizzando la regione del promotore *inh*A e il gene *kat*G. I test vengono eseguiti sui sistemi cobas 6800/8800, con il DNA estratto automaticamente e la PCR eseguita in real-time.

5.1.7. GenoType MTBDR plus e GenoType MTBsl (Bruker/HAIN Lifescience, Nehren, Germany)

Sono LPAs cioè test che si basano sull'ibridazione inversa di amplificati, prodotti in una PCR multiplex, con sonde legate a un supporto di nitrocellulosa. I due test sono progettati per identificare le mutazioni più comuni associate a resistenza agli agenti anti-TB di prima e seconda linea e possono essere utilizzati a partire da coltura positiva (vedi Annesso 5), ma anche da campione diretto risultato positivo all'esame microscopico. Il test può essere anche effettuato su campioni di espettorato microscopicamente negativi ma PCR positiva.

5.1.8. Genoscholar™ PZA-TB (Nipro, Osaka, Giappone)s o c i c z i o n e

È un LPA con tecnologia basata sull'ibridazione inversa per il rilevamento della resistenza alla pirazinamide. Il test ha come targets una porzione di 700 coppie di basi (bp) che copre l'intero gene *pncA* e la regione del promotore fino al nucleotide -18 del ceppo selvaggio di riferimento H37Rvs. L'assenza di legame con la sonda wild type indica la presenza di mutazione. La prima versione del test conteneva 47 sonde, la seconda versione contiene 48 sonde, tre delle quali (*pncA* 16, 17 e 35) rappresentano mutazioni silenti note per essere marcatori genetici non associati a resistenza alla pirazinamide: Gly60Gly (sonda 16), Ser65Ser (sonda 17) e Thr142Thr (sonda 35).

5.2. PROGRAMMEDI VALUTAZIONÉ ESTERNA DI QUALITÀ

Fra i programmi di proficiency disponibili in commercio, i seguenti sono in grado di valutare i test di amplificazione per la ricerca diretta di MTB:

- Quality Control for Molecular Diagnostics (QC), Glasgow (UK), http://www.qcmd.org, invia 10-12 campioni all'anno recapitati in unica spedizione, con una deadline di circa 40 giorni per l'invio delle risposte;
- · Institute for Standardization and Documentation in the Medical Laboratory (INSTAND), Düsseldorf (Germania), http://www.instand-ev.de, spedisce 10 campioni all'anno recapitati in 2 invii. I tempi di risposta sono piuttosto ristretti (una settimana);
- · UK National External Quality Assessment Service for Microbiology (NEQAS), London (UK), http://www.ukneqasmicro.org.uk (distribuito in Italia da Oxoid). Il programma NEQAS prevede l'esecuzione del test di amplificazione diretta su due campioni inviati mediamente 3 volte l'anno. Su tali campioni è possibile eseguire anche il test molecolare di resistenza alla rifampicina e test di genotipizzazione. La *deadline* per l'invio delle risposte è unica ed è di circa 3 mesi.

BIBLIOGRAFIA 5

- 1. Manual for selection of molecular WHO-recommended rapid diagnostic tests for detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 2. Update on the use of nucleic acid amplification tests to detect TB and drug-resistant TB: rapid communication. Geneva: World Health Organization; 2021 (https://www.who.int/publications/i/item/update-on-the-use-of-nucleic-acid-amplification-tests-to-detect-tb-and-drug-resistant-tbrapid-communication).
- 3. WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 4: treatment drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2020 (https://www.who.int/publications/i/item/9789240007048).
- 4. World Health Organization. (2021). WHO operational handbook on tuberculosis: module 3: diagnosis: rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/342369. License: CC BYNC-SA 3.0 IGO
- 5. GLI website: https://www.stoptb. org/wg/gli/gat.asp.



6. Annesso 5 - DETERMINAZIONE MOLECOLARE DELLA FARMACO RESISTENZA

6.1. BASI MOLECOLARI DELLA FARMACO-RESISTENZA IN MTB

Nel bacillo tubercolare solitamente le resistenze insorgono attraverso mutazioni cromosomiche spontanee o indotte da pressione selettiva [1, 2].

6.1.1. RIFAMPICINA, ISONIAZIDE ED ETIONAMIDE

La rifampicina è l'antibiotico ideale per la valutazione molecolare della resistenza. Infatti, oltre il 95% delle mutazioni a cui è associato il fenotipo resistente è circoscritto a una regione di sole 81 pb del gene *rpoB* (55). L'80-95% (la percentuale varia nei diversi Paesi) dei ceppi rifampicino-resistenti è anche isoniazide-resistente [3]; per questo motivo la resistenza alla rifampicina è spesso considerata un marcatore dei ceppi MDR.

Le tecniche che utilizzano l'amplificazione del DNA per rilevare la rifampicino-resistenza rappresentano, dunque, strumenti di utilità clinica rilevante. Esse permettono, infatti, di identificare precocemente quei pazienti che non possono trarre giovamento da una terapia standard – che può anzi portare allo sviluppo di nuove resistenze – e che richiedono, invece, un trattamento di associazione con farmaci di seconda scelta.

La resistenza all'isoniazide è causata da mutazioni su più di un gene: circa il 60-80% delle mutazioni interessa il codone 315 del gene codificante per la catalasi-perossidasi (katG), ma mutazioni responsabili di farmacoresistenza sono state individuate anche in altri geni, soprattutto inhA (10-20%) [3].

L'etionamide è un farmaco di seconda linea che può essere considerato una valida alternativa all'isoniazide in caso di TB-MDR: è infatti un analogo strutturale dell'isoniazide e ne condivide il target, l'enoil-ACP reduttasi codificata dal gene *inhA*. Isoniazide ed etionamide, pur essendo entrambi profarmaci, presentano meccanismi di attivazione diversi; la prima è attivata da una catalasi-perossidasi (*Kat*G) e la seconda da una monoossigenasi (*Eth*A) sotto il controllo del repressore *ethR*: mutazioni in *katG* e in *ethA/ethR* portano, rispettivamente, a resistenza alla sola isoniazide e alla sola etionamide. È questo il razionale dell'utilizzo clinico dell'etionamide nei casi di isoniazide-resistenza [4]. Mutazioni in *ethA* sono state osservate nel 50% dei casi di resistenza all'etionamide, ma la percentuale varia molto da studio a studio [4, 5, 6, 7, 8].

6.1.2. ETAMBUTOLO E PIRAZINAMIDE

L'analisi di sequenza ha portato a identificare una regione determinante per la resistenza all'etambutolo nel gene *embB*, la mutazione più rilevante consiste in una sostituzione di una base nel codone 306 (70% dei casi circa). La modesta concordanza tra l'identificazione della mutazione e la resistenza al test fenotipico (in terreno liquido MGIT 960) potrebbe essere correlata alla performance subottimale di quest'ultimo.

L'attività battericida della pirazinamide è subordinata all'attivazione di tale farmaco da parte dell'enzima pirazinamidasi, posseduto da vari micobatteri fra cui *Mycobacterium tuberculosis*. La resistenza alla pirazinamide è determinata dal deficit dell'attività pirazinamidasica conseguente alla comparsa di mutazioni nel gene *pncA* che codifica per la pirazinamidasi [2]. Il 72-97% dei ceppi pirazinamide-resistenti presentano mutazioni missense in *pncA* o nella regione regolatoria. Poiché le mutazioni finora descritte sono numerose, l'unico approccio molecolare attualmente possibile è l'analisi di sequenza del gene *pncA*. Non tutte le mutazioni identificate sono tuttavia associate a un deficit

funzionale della pirazinamidasi [9]. I ceppi che appartengono al lineage 1 hanno valori di MIC più alti rispetto a quelli appartenenti ad altri lineages.

6.1.3. AMINOGLICOSIDI E PEPTIDI CICLICI

La streptomicina interferisce sulla sintesi proteica. Per la resistenza alla streptomicina sono state identificate varie mutazioni specifiche, la più frequente delle quali interessa il codone 43 del gene *rpsL*; essa è presente tuttavia solo nel 54% dei ceppi resistenti. L'8% dei ceppi resistenti è mutato in due regioni ristrette del gene *rrs*.

Dato che anche altri aminoglicosidi (kanamicina e amikacina) e la capreomicina hanno come bersaglio la sintesi proteica, mutazioni che colpiscono le stesse regioni geniche possono conferire resistenza a diversi farmaci. *Mycobacterium tuberculosis* sviluppa resistenza ad antibiotici quali amikacina, kanamicina e capreomicina mediante acquisizione di mutazioni nucleotidiche nel gene *rrs*; tali mutazioni sono presenti nel 70-80% dei ceppi resistenti [10]. In particolare, la transizione A→G alla posizione 1401 è associata a resistenze ad alto livello a kanamicina e amikacina nel 60-100% dei ceppi [10]. Anche il gene *tlyA*, che codifica per una metiltransferasi che metila gli rRNA 16S e 23S, conferisce, se mutato, resistenza alla capreomicina [2, 7]. Mutazioni in *tlyA* sono responsabili della mancata metilazione degli rRNA in corrispondenza dei siti di legame della capreomicina e conseguentemente dello sviluppo di resistenza [11]. Anche mutazioni che colpiscono i geni *gid*B ed *eis* sono coinvolte nell'insorgenza di resistenza agli aminoglicosidi. Mutazioni nella regione del promotore di *eis* sembrano conferire resistenza a bassi livelli alla kanamicina in MTB [12].

6.1.4. FLUOROCHINOLONI | clinici italiani

Come per altri farmaci, anche per i fluorochinoloni si osserva una rapida insorgenza di resistenza quando questi vengono utilizzati in monoterapia o in associazione a un solo altro farmaco verso cui il ceppo sia resistente. Il principale meccanismo di resistenza è attribuibile a mutazioni nel gene *gyrA* che codifica per la subunità A della DNA girasi. Tali mutazioni impediscono il legame del farmaco all'enzima che ne costituisce il target. Le principali mutazioni associate a resistenza interessano una regione ristretta di circa 120 pb e sono presenti nel 70-90% dei ceppi di MTB resistenti a tale farmaco [2, 7]. Tali mutazioni colpiscono soprattutto il codone 94 e il codone 90.

6.2. RESISTENZE CROCIATE

La cross-resistenza è molto comune tra farmaci di uno stesso gruppo che condividono lo stesso bersaglio molecolare, quali ad esempio i fluorochinoloni. Nell'ambito degli aminoglicosidi, si osserva cross-resistenza completa tra amikacina e kanamicina, mentre la maggior parte dei ceppi streptomicina-resistenti sono sensibili a questi due farmaci [13].

Per quanto riguarda la classe delle rifamicine, le mutazioni ai codoni 526 e 531 del gene *rpoB* conferiscono alti livelli di resistenza a rifampicina, rifabutina e rifapentina [14], mentre le mutazioni ai codoni 516 e 522 conferiscono rifampicino-resistenza non associata, nel 90% dei casi, a resistenza alla rifabutina.

6.3. IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DEL PROFILO DI RESISTENZA DI MTB

L'esecuzione dell'antibiogramma fenotipico viene ancora eseguito su tutti i ceppi di primo isolamento e/o quando il paziente non risponde alla terapia Le tecniche molecolari hanno il vantaggio di essere molto più rapide e si rivelano particolarmente utili in caso di

sospetta tubercolosi MDR. Per questo motivo, l'OMS raccomanda l'utilizzo di test molecolari per l'identificazione rapida della tubercolosi MDR e pre-XDR quando sospetta [15, 16]. L'OMS ha recentemente pubblicato la lista delle mutazioni da considerare associate al fenotipo di resistenza [3, 17]. Non tutti i test molecolari commerciali sono in grado di identificare tutte le mutazioni associate ai fenotipi di resistenza. La maggior parte dei test molecolari ha come target le mutazioni più frequenti associate alla farmaco resistenza. I test basati su targeted NGS hanno invece la capacità di evidenziare tutte le mutazioni presenti nei geni considerati. L'utilizzo del WGS su ceppi cresciuti in coltura permette un'analisi accurata di tutti i geni associati alla farmaco resistenza predicendo sia la resistenza che la sensibilità [18].

L'analisi applicata al DNA estratto da isolati di *Mycobacterium tuberculosis* fornisce risultati soddisfacenti, ma è dipendente dai tempi, relativamente lunghi, dell'esame colturale. La sensibilità del test impiegato direttamente su campioni clinici, sia respiratori che extrapolmonari, è comparabile a quella relativa ai ceppi isolati soltanto quando i campioni sono positivi all'esame microscopico. Nei campioni microscopico-negativi la sensibilità è invece insufficiente, probabilmente a causa della resa subottimale del processo di estrazione del DNA dai micobatteri.

Il sequenziamento delle regioni interessate da mutazioni rappresenta certamente la metodica di riferimento; tuttavia, l'impiego in routine di metodiche molecolari per l'identificazione rapida di farmaco-resistenze in MTB non può prescindere da un'accurata analisi di costo-efficacia.

6.3.1. LA TECNOLOGIA LINE PROBE ASSAY

La tecnologia Line Probe Assay (LPA) ha notevolmente semplificato l'esecuzione dei test molecolari per la determinazione di farmaco-resistenza. I test LPA si basano sull'ibridazione inversa di amplificati, prodotti in una PCR multiplex, con sonde legate a un supporto di nitrocellulosa. Tali sonde coprono sequenze della regione d'interesse che si sovrappongono parzialmente; alcune sono prive di mutazioni (wild-type) altre sono specifiche per le mutazioni più comuni. L'amplificazione viene eseguita utilizzando *primer* biotinilati. Dopo denaturazione, gli amplificati, a singolo filamento marcati con 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 dalla presenza di ibridazione di una o più sonde mutate o dall'assenza di ibridazione di una o più sonde *wild-type* (resistenza dedotta "*inferred*"). L'ibridazione e la rilevazione possono essere automatizzate [19].

Le sonde LPA, approvate dall'OMS, sono progettate per identificare le mutazioni più comuni associate a resistenza agli agenti anti-TB di prima e seconda linea, inclusa la PZA [19]. Possono essere utilizzate a partire da coltura positiva, ma anche da campione diretto risultato positivo all'esame microscopico. Il test può essere anche effettuato su campioni di espettorato microscopicamente negativo ma PCR positiva (vedi *Annesso 4*) [19].

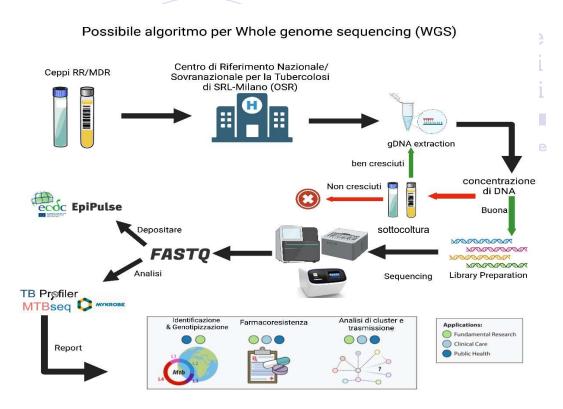
La sensibilità e specificità totale del LPA di prima linea (GenoType MTBDR plus, versione 2) da campione diretto è rispettivamente del 95.8% e 98.4% per il rilevamento della resistenza alla RIF (regione hot spot del gene rpoB), mentre è rispettivamenente del 94.5% e 99.3% per il rilevamento della resistenza all'INH (geni katG e inhA). Le mutazioni in katG sono responsabili di resistenze anche ad alte concentrazioni di isoniazide, le mutazioni in inhA provocano resistenze a basse dosi che possono essere aggirate utilizzando il farmaco a concentrazione più elevata [20, 21].

La sensibilità e specificità totale del LPA di seconda linea (Genotype MTBDR*sl*, versione 2) da campione diretto è rispettivamente del 86.2% e 98.6% per il rilevamento della resistenza ai fluorochinoloni, mentre è del 87.0% e 99.5% per il rilevamento della resistenza agli aminoglicosidi (iniettabili).

La sensibilità e specificità totale del LPA per la PZA (Genoscholar PZA-TB) da coltura positiva è rispettivamente del 81.2% e 97.8%, per il rilevamento della resistenza alla Pirazinamide [19]

6.3.2. IL SEQUENZIAMENTO DELL'INTERO GENOMA (WGS)

Negli ultimi anni il sequenziamento dell'intero genoma dei ceppi di *M. tuberculosis* si è affermato come metodo rapido per il rilevamento delle resistenze genotipiche [22, 23]. Programmi quali PhyResSE [24], TB profiler (https://tbdr.lshtm.ac.uk) ed altri sono in grado di rilevare direttamente dai dati grezzi prodotti dal sequenziatore (file FASTQ) le mutazioni responsabili di resistenza a tutti i farmaci, sia di prima che di seconda linea. Il Regno Unito è il primo paese ad aver avviato un programma centralizzato di sequenziamento totale di routine di tutti i ceppi di *M. tuberculosis* isolati nel Paese [25] proponendo di eliminare il DST fenotipico per i ceppi completamente wild type. L'Olanda sta seguendo lo stesso algoritmo con un consistente risparmio di fondi.



6.4. DISCORDANZE FENOTIPO/GENOTIPO

La convinzione che l'antibiogramma fenotipico rappresenti comunque il gold-standard è stata negli ultimi anni rimessa in discussione dall'individuazione di alcune mutazioni nell'hot-spot del gene *rpoB* associate ad esito sfavorevole della terapia con rifampicina, nonostante che, in MGIT, risultasse sensibilità al farmaco [26]. In presenza di tale discordanza fenotipo/genotipo la sensibilità al MGIT non può essere considerata il gold standard e deve essere eventualmente verificata mediante sequenziamento dell'hot spot di *rpoB* [27]. Nel test GenoType MTBDR*plus* v.2 sono associate a falsa resistenza al MGIT

alcune mutazioni evidenziate dalle sonde WT2, WT3+WT4, WT5+WT6, WT8 e dalla sonda WT7 (quest'ultima sia da sola che in associazione con MUT1 o con MUT2) (Tabella 1). La riduzione della concentrazione critica della rifampicina ha contribuito a ridurre il numero dei casi di discordanti.

Le discrepanze fenotipo/genotipo hanno molteplici cause, spesso legate al fatto che le mutazioni riscontrate aumentano la MIC a valori vicino alla concentrazione critica o la stessa concentrazione critica è troppo alta.

L'OMS include nel catalogo delle mutazioni legate a resistenza anche regole interpretative diverse per farmaco.

Tabella 1 - Mutazioni responsabili di resistenza alla rifampicina (e corrispondenti sonde del sistema GenoType MTBDR*plus*) che possono essere associate a falsa sensibilità al farmaco in MGIT.

	Sonde GenoType wild tipe mutata		mutazione
			mutazione
	WT2	nessuna	L511P
	WT3/WT4	nessuna	
	WT5/WT6	nessuna	S522Q S S
		MUT2A	H526Y i
	WT7	MUT2B	H526D] i i
	WT8	noccupa	H526N
		nessuna	H526L
		nessuna	L533P

IBLIOGRAFIA 6

- 1. Almeida da Silva P.E., Von Groll A., Martin A., Palomino J.C., *Efflux as a mechanism for drug resistance in* Mycobacterium tuberculosis, 2011, FEMS Immunol Med Microbiol; 63:1–9.
- 2. Almeida da Silva P.E., Palomino J.C., Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs, 2011, J Antimicrob Chemother, 2011; 66:1417–1430.
- 3. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 4. Brossier F., Veziris N., Aubry A., Jarlier V., Sougakoff W., *Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant* Mycobacterium tuberculosis *complex isolates*, 2010, J Clin Microbiol; 48:1683–1689.
- 5. Boonaiam S., Chaiprasert A., Prammananan T., Leechawengwongs M., *Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand*, 2010, Clin Microbiol Infect; 16:396–399.
- 6. DeBarber A.E., Mdluli K., Bosman M., Bekker L.G., Barry C.E. III, Ethionamide activation

- and sensitivity in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis, 2000, Proc Natl Acad Sci USA; 97:9677-9682.
- 7. Morlock G.P., Metchock B., Sikes D., Crawford J.T., Cooksey R.C., ethA, inhA, and katG loci of Ethionamide resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates, 2003, Antimicrob Agents Chemother; 47:3799–3805.
- 8. Vilchéze C., Weisbrod T.R., Chen B., Kremer L., Hazbon M.H., Wang F., Alland D., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. Jr., *Altered NADH/NAD+ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria*, 2005, Antimicrob Agents Chemother; 49:708–720.
- 9. Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniewski F, Rodionova Y, Bakonyte D, Stakenas P, Pimkina E, Augustynowicz-Kopeć E, Degano M, Ambrosi A, Hoffner S, Mansjö M, Werngren J, Rüsch-Gerdes S, Niemann S, Cirillo DM. Mycobacterium tuberculosis pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. MBio. 2014;5:e01819-14.
- 10. Georghiou S.B., Magana M., Garfein R.S., Catanzaro D.G., Catanzaro A., Rodwell T.C., Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review, 2012, PLoS One; 7:e33275.
- 11. Johansen S.K., Maus C.E., Plikaytis B.B., Douthwaite S., *Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-0-methylations in 16S and 23S rRNAs*, 2006, Molecular Cell; 23:173–182.
- 12. Chen W., Biswas T., Porter V.R., Tsodikov O.V., Garneau-Tsodikova S., *Unusual regioversatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-TB*, 2011, Proc Natl Acad Sci USA: 108:9804–9808.
- Blumberg H.M., Burman W.J., Chaisson R.E., Daley C.L., Etkind S.C., Friedman L.N., Fujiwara P., Grzemska M., Hopewell P.C., Iseman M.D., Jasmer R.M., Koppaka V., Menzies R.I., O'Brien R.J., Reves R.R., Reichman L.B., Simone P.M., Starke J.R., American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention and the Infectious Diseases Society, *Treatment of tuberculosis*, 2003, Am J Respir Crit Care Med; 167:603-662.
- 14. Bodmer T., Zurcher G., Imboden P., Telenti A., *Mutation position and type of substitution in the bsubunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant* Mycobacterium tuberculosis, 1995, J Antimicrob Chemother; 35:345–348.
- 15. Update on the use of nucleic acid amplification tests to detect TB and drug-resistant TB: rapid communication. Geneva: World Health Organization; 2021 (https://www.who.int/publications/i/item/update-on-the-use-of-nucleic-acid-amplification-tests-to-detect-tb-and-drug-resistant-tbrapid-communication).
- 16. WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 3: diagnosis rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2021 update (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/342331/9789240029415-eng.pdf).
- 17. Miotto P., Tessema B., Tagliani E., et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug-resistance in Mycobacterium tuberculosis. Eur.Respir.J. In press, 2017
- 18. Walker, T. M. et al. Whole genome sequencing for M/XDR tuberculosis surveillance and for resistance testing. Clin Microbiol Infect 23, 161–166,

- https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.10.014 (2017).
- 19. Line probe assays for detection of drug-resistant tuberculosis: interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 20. Migliori G.B., Sotgiu G., Rosales-Klintz S., et al. European Union Standards for Tuberculosis care, 2017 update. Eur.Respir.J. in press, 2017.
- 21. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 22. Marais BJ, Walker TM, Cirillo DM, Raviglione M, Abubakar I, van der Werf MJ, Boehme C, Niemann S, Castro KG, Zumla A, Sintchenko V, Crook DW. Aiming for zero tuberculosis transmission in low-burden countries. Lancet Respir Med. 2017; pii:S2213-2600(17)30382-X.
- 23. Pankhurst LJ, del Ojo Elias C, Votintseva AA, Walker TM, Cole K, Davies J, Fermont JM, Gascoyne-Binzi DM, Kohl TA, Kong C, Lemaitre N, Niemann S, Paul J, Rogers TR, Roycroft E, Smith EG, Supply P, Tang P, Wilcox MH, Wordsworth S, Wyllie D, Xu L, Crook DW. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. Lancet Respir. Med. 2016; 4: 49–58. 6. 30.
- 24. Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, Kohl TA, Miotto P, Cirillo DM, Cabibbe AM, Niemann S, Fellenberg K. PhyResSE: a Web Tool Delineating Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. J Clin Microbiol. 2015 Jun;53:1908-14.
- 25. Walker TM, Cruz ALG, Peto TE, Smith EG, Esmail H, Crook DW. Tuberculosis is changing. Lancet Infect. Dis. 2017; 17: 359–361. Led Lancet Terzo Settore
- 26. Rigouts L, Gumusboga M, de Rijk WB, Nduwamahoro E, Uwizeye C, de Jong B, Van Deun A. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for Mycobacterium tuberculosis isolates with specific rpoB mutations. J Clin Microbiol 2013; 51: 2641–2645.
- 27. Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, Degano M, Cirillo DM. 2018. Role of disputed mutations in the rpoB gene in interpretation of automated liquid MGIT culture results for rifampin susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 56:e01599-17. https://doi.org/10.1128/JCM.01599-17.

7. Annesso 6 - IDENTIFICAZIONE DI MTB

È indispensabile giungere all'identificazione di tutti i micobatteri cresciuti in coltura, poiché tale informazione è cruciale per la diagnosi e la terapia. Poiché il test molecolare è il test raccomandato come test iniziale per la diagnosi di TB, nella maggior parte dei casi alla positivizzazione della coltura di campioni prelevati da pazienti identificati come casi di TB, è sufficiente confermare con la determinazione dell'antigene MPT64 la presenza di MTB. I laboratori che non eseguono l'identificazione devono inviare gli isolati a un Centro di Riferimento. Un'identificazione a livello di raggruppamento di specie è accettabile per i micobatteri facenti parte del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB). Di fondamentale importanza dal punto di vista clinico e terapeutico è la differenziazione, che deve essere effettuata nel più breve tempo possibile, tra micobatteri appartenenti al MTB e micobatteri non tubercolari (MNT).

I metodi utilizzati per l'identificazione di MTB da terreno di coltura sono metodi immunocromatografici e molecolari [1]. I metodi utilizzati per l'identificazione da campione sono molecolari.

7.1. TEST IMMUNO-CROMATOGRAFICO PER L'IDENTIFICAZIONE RAPIDA DEI CEPPI APPARTENENTI AL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Le specie appartenenti al MTB (ad eccezione di alcuni ceppi di *M. bovis* BCG e una percentuale stimata di 20-40% di *M. africanum*), ma non i micobatteri non tubercolari, secernono la proteina MPT64 [2, 3, 4]. Sulla base di questo, è possibile discriminare tra MTB e micobatteri non tubercolari. Sono stati sviluppati saggi immunocromatografici che impiegano anticorpi monoclonali contro MPT64 in grado di rilevare in pochi minuti la presenza della proteina suddetta utilizzando una goccia di brodocoltura positiva. Il test è di facile interpretazione: se positivo compare una banda specifica; una seconda banda di controllo deve comparire a conferma che il test è stato eseguito correttamente. Per i dettagli operativi si rimanda alle istruzioni del produttore.

7.2. IDENTIFICAZIONE MEDIANTÉ LPA

I sistemi di identificazione commerciali basati sull'uso di sonde molecolari [5] sono utilizzabili a partire da microrganismi cresciuti su terreno solido o liquido.

Ibridazione inversa

Esistono vari sistemi commerciali basati sulla ibridizzazione inversa, comunemente conosciuti come LPA, che permettono, con un singolo test, l'identificazione di varie specie micobatteriche (il loro numero varia a seconda del kit). I singoli kit usano come bersaglio regioni geniche differenti:

- INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2, Fujirebio Europe, Ghent, Belgium. Il kit permette il rilevamento e l'identificazione simultanea del genere *Mycobacterium* e 16 diverse specie di micobatteri, incluso MTB. Il test si basa sulle differenze nucleotidiche nella regione spaziatrice tra l'rRNA 16S e l'rRNA 23S.
- INNO-LiPA Rif. TB kit, Fujirebio Europe, Ghent, Belgium. Il kit consente di rilevare MTB e contemporaneamente la resistenza alla rifampicina per la presenza di mutazioni nel gene *rpoB*.
- Hain Lifescience GenoType CM test. Il test viene utilizzato per identificare i micobatteri più comunemente isolati dall'uomo, incluso MTB ed ha come regione bersaglio l'rRNA 23S;

- Hain Lifescience GenoType MTBC *test*. Il test distingue tra le specie del complesso tubercolare sulla base dall'rRNA 23S, dei frammenti di quattro diverse regioni del gene *gyrB* e delle seguenze adiacenti alla regione RD-1.
- Hain Lifescience GenoType MTBDR*plus* and MTBDR*sl.* Il test GenoType MTBDR*plus* consente di rilevare MTB e contemporaneamente la resistenza alla rifampicina e all'isoniazide correlata a mutazioni nei geni *rpoB* e *katG/inhA*. Il GenoType MTBDR*sl* rileva simultaneamente il MTB e la resistenza a fluorochinoloni e aminoglicosidi.

Questi test richiedono tre passaggi principali: estrazione del DNA, amplificazione mediante PCR e ibridazione. Per i dettagli operativi dei singoli kit si rimanda alle rispettive istruzioni del produttore.

BIBLIOGRAFIA 7

- Warshauer D.M., Salfinger M., Desmond E., Lin S-Y.G. Mycobacterium tuberculosis complex, in: Carroll K.C., Pfaller MA., Landry M.L., McAdam A.J., Patel R., Richter S.S., Warnock D.W., Manual of clinical microbiology, 12th edition, 2019, ASM Press, Washington DC; 576-594.
- 2. Cao XJ, Li YP, Wang JY, Zhou J, Guo XG (2021) MPT64 assays for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Infect Dis. 21(1):336.
- 3. Chew K, Lin R, Teo J (2017) MPT64 gene mutations leading to non-reactivity on a rapid immunochromatographic assay. The Journal Of Infection In Developing Countries 11 (04): 371-373.
- 4. Ofori-Anyinam B, Kanuteh F, Agbla SC, Adetifa I, Okoi C, Dolganov G, Schoolnik G, Secka O, Antonio M, de Jong BC, Gehre F (2016) Impact of the *Mycobaterium africanum* West Africa 2 lineage on TB diagnostics in West Africa: decreased sensitivity of rapid identification tests in The Gambia. PLoS Negl Trop Dis; 10(7):e0004801.
- 5. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance in cultures and sputum using molecular assays and immunoassaysIn: ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2018.

8. Annesso 7 - TEST FENOTIPICI DI SENSIBILITÀ AI FARMACI

Dal momento che le forme di TB resistenti ai farmaci si stanno diffondendo a livello globale, rappresentando una seria minaccia alle attuali strategie di controllo della malattia, l'antibiogramma è ritenuto indispensabile per tutti i ceppi MTB di primo isolamento. Il test di sensibilità dovrebbe essere eseguito utilizzando i farmaci di prima linea (etambutolo, isoniazide, pirazinamide e rifampicina) e dovrebbe essere ripetuto se, dopo 3 mesi di terapia, le colture del paziente continuano ad essere positive. Altri farmaci anti-tubercolari, classificati in tre gruppi (Tabella 1) dovrebbero essere testati solo in presenza di resistenze accertate a quelli di prima linea e solo in Laboratori di Riferimento. I ceppi definiti MDR (multidrug resistant) sono resistenti ad almeno rifampicina e isoniazide; i ceppi pre-XDR (extensively drug resistant) sono resistenti, oltre che a rifampicina e isoniazide, ai fluorochinoloni; i ceppi XDR sono isolati MDR resistenti anche ai fluorochinoloni e ad almeno un altro farmaco di gruppo A [1].

I saggi di sensibilità qualitativi, che utilizzano un'unica concentrazione di farmaco, definita "concentrazione critica", consentono di determinare se il ceppo di MTB in esame è sensibile o resistente a tale molecola. La concentrazione critica di un farmaco antitubercolare è definita come la più bassa concentrazione in grado di inibire *in vitro* il 99% dei ceppi fenotipicamente selvatici appartenenti a *M. tuberculosis* complex. Questo approccio si è dimostrato valido per il bacillo tubercolare perché i ceppi selvatici (*wild type*) presentano una notevole uniformità nel grado di sensibilità ai farmaci e perché le concentrazioni attive sui ceppi sensibili e resistenti sono nettamente differenti. I metodi quantitativi consentono di misurare il grado di sensibilità determinando la concentrazione minima inibente (MIC), definita come la più bassa concentrazione del farmaco capace di inibire *in vitro* la crescita visibile della popolazione micobatterica in esame.

Per il saggio della sensibilità del bacillo tubercolare ai farmaci esistono diversi approcci: i metodi su terreno solido (metodo delle proporzioni e della concentrazione assoluta), il saggio in terreno liquido con il sistema automatico MGIT e il metodo di microdiluizione in brodo utilizzando sia test commerciali che saggi home-made, tra cui il metodo basato sul protocollo sviluppato da EUCAST, a tutti gli effetti considerato il metodo di riferimento per la determinazione delle MIC [2,3]. Nella Tabella 2 sono riportate le concentrazioni raccomandate per il saggio nei diversi terreni [4-6].

8.1. SAGGIO DI SENSIBILITA' SU TERRENO SOLIDO (METODO DELLE PROPORZIONI)

Il razionale del metodo delle proporzioni si basa sull'osservazione empirica secondo la quale, se in una popolazione micobatterica è presente più dell'1% di mutanti resistenti a un farmaco, tale popolazione è da considerarsi resistente, in quanto la percentuale suddetta è destinata ad aumentare rapidamente per effetto della pressione selettiva esercitata da un trattamento chemioterapico che utilizzi il farmaco in questione [2]. Si definisce resistente un ceppo che presenti una riduzione del grado di sensibilità tale da differenziarlo inequivocabilmente da un ceppo wild type.

Per il test di sensibilità del bacillo tubercolare possono essere utilizzati sia terreni a base di uovo, quale il Löwenstein-Jensen, sia i terreni agarizzati, Middlebrook 7H10 e 7H11. Una sospensione standardizzata del ceppo in esame viene inoculata su una serie di terreni solidi contenenti i singoli farmaci nonché su un terreno di controllo. La stessa sospensione, diluita 1/100, viene inoculata su una seconda serie di terreni contenenti i singoli farmaci e su un secondo terreno di controllo. La lettura viene eseguita utilizzando

soltanto una delle due serie di terreni: quella che presenta, sul controllo, un numero di colonie compreso fra 50 e 500. Si calcola la proporzione fra il numero delle colonie cresciute su ciascun terreno antibiotato e il numero di quelle presenti sul controllo. Il criterio dell'1% viene utilizzato per determinare la sensibilità o la resistenza. Il metodo non è utilizzabile per la pirazinamide.

8.2. SAGGIO DI SENSIBILITA' IN TERRENO LIQUIDO CON IL SISTEMA MGIT

Con una sospensione batterica standardizzata si inoculano una serie di provette MGIT addizionate con i singoli farmaci nonché una provetta di controllo senza antibiotico. Il rilevamento della fluorescenza e l'interpretazione dei risultati avvengono in maniera automatizzata. Il sistema usa un algoritmo, basato sul principio del metodo delle proporzioni, per comparare le cinetiche di crescita in assenza e in presenza di farmaco e per interpretarle in termini di sensibilità e di resistenza. Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore.

Per l'esecuzione del protocollo per l'antibiogramma esteso ai farmaci di seconda scelta [7], basato sull'utilizzo del sistema automatizzato MGIT 960 è richiesto il collegamento dello strumento a un computer con il software EpiCenter e TB eXiST (Becton Dickinson Sparks, MD, USA). TB eXiST offre all'operatore il controllo continuo (sia numerico che grafico) della crescita dei micobatteri a contatto con il farmaco. Partendo da una coltura in MGIT è possibile effettuare simultaneamente l'antibiogramma ai farmaci di prima e di seconda linea e anche testare nuove molecole; di ciascun farmaco è possibile saggiare più concentrazioni. Per interpretare i dati è necessario che il controllo di crescita abbia raggiunto un valore >400 GU (unità di crescita); a questo punto il ceppo sarà da considerare resistente ai farmaci contenuti nei tubi con GU >100 e sensibile a quelli contenuti nei tubi con GU <100.

8.3. SAGGIO DI SENSIBILITA' IN MICRODILUIZIONE CON IL SISTEMA SENSITITRE

Ente del Terzo Settore

Da alcuni anni è disponibile in commercio un sistema di microdiluizione in brodo Sensititre (sistema Thermo Scientific™ Sensititre™) per il test di sensibilità del bacillo tubercolare che include sulla stessa piastra farmaci di prima e di seconda linea. Il sistema permette la determinazione delle concentrazioni minime inibenti (MIC) utilizzando piastre a 96 pozzetti contenenti diluizioni per raddoppio di vari antibiotici allo stato liofilo. Partendo da una sospensione batterica standardizzata (5x10⁵ UFC/mL) in brodo Middlebrook 7H9 con OADC, si dispensano 100 µL in ciascun pozzetto e si sigilla la piastra con una pellicola adesiva. La piastra viene incubata per 7 giorni o, in caso di crescita non ottimale nel pozzetto di controllo, per ulteriori 7 giorni. La crescita appare come torbidità o come deposito di cellule sul fondo del pozzetto ed è rilevabile attraverso l'utilizzo di uno specchio oppure con un lettore di piastre non automatizzato. La MIC corrisponde alla concentrazione più bassa di antimicrobico in grado di inibire la crescita visibile. Per i dettagli tecnici si rimanda alle istruzioni del produttore.

8.4. SAGGIO DI SENSIBILITA' AI FARMACI DI SECONDA LINEA

8.4.1 - SCENARI E NUOVE STRATEGIE

La recente categorizzazione dei farmaci antitubercolari operata nell'ambito della strategia "The End TB strategy" [8] pone l'accento sull'utilizzo di una combinazione di farmaci antitubercolari efficaci per il trattamento della tubercolosi resistente. L'efficacia

in vitro di queste molecole dovrebbe essere verificata prima del loro utilizzo come parte di un algoritmo diagnostico nazionale secondo il quale <u>tutti i casi</u> di tubercolosi resistente (rifampicina-resistente, MDR, pre-XDR e XDR) dovrebbero essere testati per tutti i farmaci antitubercolari a disposizione, incluse molecole di nuova generazione che non rientrano nelle linee guida oggi consultabili, per esempio il Pretomanid. L'introduzione di una simile strategia garantirebbe innanzitutto un elenco di farmaci efficaci a disposizione dei medici che devono prescrivere la terapia e prevederne l'efficacia; ed in secondo luogo ne beneficerebbero i pazienti la cui guarigione rappresenta il fine ultimo di tutto il lavoro svolto a livello clinico. laboratoriale ed amministrativo. Tuttavia. in Paesi a (relativamente) bassa incidenza di casi resistenti, come l'Italia, la fattibilità di questo approccio può essere minata non tanto dalla mancanza di mezzi ma dalla mancanza di un sistema chiaro di comunicazione tra laboratori. Un ulteriore ostacolo all'attuazione di una tale strategia è rappresentata dalla mancanza delle materie prime (polveri pure di farmaco) per eseguire i test di sensibilità che, comprensibilmente, non sono acquistate per eseguire un numero esiguo di test all'anno. Nell'ultimo guinguennio infatti, le notifiche di casi MDR/XDR sono in lieve dimuzione intorno ai 70 casi/anno; settanta pazienti a cui dovremmo offrire la migliore cura possibile con tutti i mezzi e le evidenze diagnostiche a disposizione: attraverso un piano nazionale condiviso potremmo realmente raggiungere questo obiettivo, utilizzando i mezzi che già abbiamo a disposizione, ottimizzandone la gestione e addirittura migliorandone il risultato finale. Un esempio potrebbe essere la centralizzazione dei servizi nei laboratori Regionali e Nazionali di riferimento in cui svolgere gli esami fenotipici e genomici per la sorveglianza della resistenza ai nuovi farmaci.

Le aree principali che maggiormente risentirebbero di una politica condivisa di questo tipo corrispondo alle aree che oggi presentano le maggiori criticità e che per brevità sintetizziamo nella mancanza di completezza dell'antibiogramma, che dovrebbe includere anche i nuovi farmaci, e nella possibilità di garantire a tutti i pazienti l'accesso alle nuove tecnologie che permettano una diagnosi accurata di farmaco-resistenza in tempi brevi (Whole Genome Sequencing o tNGS) (vedi Annesso 8). Se da un lato quindi, il numero esiguo di casi resistenti all'anno permetterebbe a tutti i pazienti di avere una diagnosi completa, dall'altro non si insiste mai abbastanza sulla mancanza di un piano nazionale che lo renda possibile. In aggiunta, i laboratori che eseguono pochi test all'anno non possono raggiungere la competenza di laboratori di riferimento che, lavorando anche con paesi ad alta incidenza di TB, eseguono parecchie centinaia di test all'anno.

Ciò che a livello internazionale, solo recentemente, è stato definito "Universal Access to Care" dovrebbe essere una qualità distintiva italiana per non venire meno al principio trainante della nostra Legge Fondamentale che all'articolo 32 riporta "La Repubblica tutela la salute come fondamentale diritto dell'individuo e interesse della collettività, e garantisce cure gratuite agli indigenti". Nel nostro caso la "tutela della salute" passa inevitabilmente da una diagnosi rapida e completa di farmaco-resistenza che per la malattia tubercolare potrebbe essere ritardata di mesi dalla comparsa dei sintomi.

8.4.2. – METODOLOGIA

Il saggio di sensibilità ai nuovi farmaci antitubercolari si esegue in base agli stessi protocolli e procedure con cui si testano i farmaci di prima linea. In particolare, i metodi in terreno liquido offrono un'ottima sintesi in termini di sensibilità, riproducibilità e tempi di refertazione (cfr. SAGGIO DI SENSIBILITA' IN TERRENO LIQUIDO CON IL SISTEMA MGIT; SAGGIO DI SENSIBILITA' IN MICRODILUIZIONE CON IL SISTEMA SENSITITRE), sebbene

non siano preclusi i test in terreno solido che però hanno evidenti svantaggi tra cui il metodo di preparazione e i tempi di svolgimento del test.

Il passaggio più critico che deve essere tenuto sotto stretta osservazione per l'esecuzione dei test di seconda linea e nuovi farmaci sono la preparazione iniziale delle soluzioni di farmaco che saranno utilizzate per il saggio. Le soluzioni di stoccaggio (stock solutions) hanno scadenza semestrale e sono preparate seguendo le procedure operative interne del singolo laboratorio che fanno riferimento a manuali tecnici elaborati da esperti internazionali [3,5,6]. I manuali sopramenzionati includono un'ampia descrizione delle situazioni problematiche che possono presentarsi durante la produzione delle soluzioni di farmaco, offrendo quindi un riferimento irrinunciabile quando si vuole introdurre nell'algoritmo di laboratorio l'antibiogramma partendo da soluzioni di farmaco di propria produzione. Per tutti i dettagli si rimanda alla bibliografia alla fine del capitolo [3,5,6].

La tabella 2 descrive le concentrazioni a cui dovrebbero essere eseguiti i test di sensibilità a codifica binaria "sensibile (S)/Resistente (R)". Per ogni concentrazione test (tranne che per la clofazimina), è possibile produrre soluzioni di stoccaggio (stock solutions) che corrispondono alle soluzioni di lavoro (working solutions). Le concentrazioni a cui conservarle, variano a seconda del test che si intende fare e devono far riferimento alle procedure standard interne di laboratorio.

In linea generale, per ogni polvere di farmaco acquistata è consigliabile tenere un registro dei Certificati di Qualità riferiti al lotto acquistato, riportante le seguenti informazioni:

- Società produttrice, numero di lotto e codice aziendale
- Eventuale data di scadenza
- Purezza della polvere ed eventuali fattori di correzione. Nel caso non fosse specificato il fattore di correzione (valore adimensionale) è necessario calcolarlo in base alla purezza della polvere.
- Solubilità

Il nuovo regime corto per il trattamento della TB MDR include un nuovo nitroimidazolo, il pretomanid che può solo, ad oggi, essere utilizzato nell'ambito di un regime terapeutico in associazione con bedaquilina e linezolid [8].

Tabella 1 - Farmaci anti-tubercolari

GRUPP0	FARMACO	
	Rifampicina	
	Rifapentina, Rifabutina	
I linea	Isoniazide	
	Etambutolo (Gruppo C)	
	Pirazinamide (Gruppo C)	
	Levofloxacina	
Cruppo A	Moxifloxacina	
Gruppo A	Bedaquilina	
	Linezolid	
Gruppo B	Clofazimina	
от арро Б	Cicloserina	
	Delamanid	
	Imipenem-cilastina	
	Meropenem	
Cruppo C	Amikacina	
Gruppo C	Streptomicina	. е
	Etionamide Microbiolog	J 1
	Protionamide linici italiai	n i
	Acido p-aminosalicilico	

Ente del Terzo Settore

enter in azioni di inicine degli di inicine (pg)						
GRUPPO	FARMACO	SOLVENTE	L-J	7H10	7H11	MGIT
I linea	Etambutolo	H ₂ 0	2.0	5.0	7.5	5.0
	Isoniazide	H ₂ 0	0.2	0.2	0.2	0.1/0.4
	Pirazinamide	H ₂ 0	_	_	_	100
	Rifampicina	H ₂ 0	40.0	0.5	1.0	0.5
Chinoloni	Levofloxacina	Na0H 0,1N	2.0	1.0	_	1.0
	Moxifloxacina	H ₂ 0	1.0	0.5	0.5	0.25
		CC				
		СВ	_	2.0	_	1.0
Iniettabili	Amikacina	H ₂ 0	30.0	2.0	_	1.0
	Capreomicina	H ₂ 0	40.0	4.0	_	2.5
	Kanamicina	H ₂ 0	30.0	4.0	_	2.5
	Streptomicina	H ₂ 0	4.0	2.0	2.0	1.0
Altri II	Etionamide	DMSO**	40.0	5.0	10.0	5.0
linea	Linezolid	H_2O	_	1.0	1.0	1.0
	Clofazimina	DMS0	π ss	ciaz	ione	1.0
Speciali	Bedaquilina	DMS0			0.25	1.0
//	Delamanid	DMS0	111101		0.016	0.06

Tabella 2 - Concentrazioni critiche degli antibiotici (µg/mL) impiegati nel trattamento della TB

BIBLIOGRAFIA 8

- 1. WHO Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drugresistant tuberculosis. 2020.
- 2. Warshauer D.M., Salfinger M., Desmond E., Lin S-Y.G. *Mycobacterium tuberculosis* complex, in: Carroll K.C., Pfaller MA., Landry M.L., McAdam A.J., Patel R., Richter S.S., Warnock D.W., Manual of clinical microbiology, 12th edition, 2019, ASM Press, Washington DC; 576–594.
- 3. ECDC Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2018.
- 4. WHO Updated interim critical concentrations for first-line and second-line DST. 2012.
- 5. WHO Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. 2018.
- 6. WHO Technical Report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). 2021.
- 7. Rusch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M., Chadwick M., Siddiqi S., Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of M. tuberculosis to classical second-line drugs and newer antimicrobials, 2006, J Clin Microbiol; 44:688-692.
- 8. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment update 2022.

^a per la Moxifloxacina sono previste due concentrazioni: la concentrazione critica (prima riga) che inibisce la crescita di almeno il 95% dei ceppi wt di *M. tuberculosis* ed il breakpoint clinico (seconda riga) che corrisponde alla MIC che separa i ceppi con alta probabilità di rispondere ad alte dosi del farmaco da quelli resistenti per cui il farmaco non dovrebbe essere utilizzato.

^{**} Utilizzati come solventi anche Etilen-glicole oppure Metanolo.

9. Annesso 8 - NGS PER LA DIAGNOSI DELLA TB E IL CONTROLLO DELLA TRASMISSIONE

I recenti progressi nella biologia molecolare hanno aumentato le possibilità di studiare la trasmissione delle malattie infettive. L'epidemiologia molecolare (EM) permette lo studio della distribuzione delle malattie nelle popolazioni umane, identificate a livello molecolare utilizzando le potenzialità del sequenziamento di nuova generazione e i dati epidemiologici classici. L'"epidemiologia molecolare" viene utilizzata per tracciare la trasmissione di specifici isolati di MTB in una comunità. Nel caso della tubercolosi, non solo permette di studiare le dinamiche di trasmissione ma anche di differenziare fallimenti terapeutici e ricadute, da nuove infezioni. La EM ha inoltre rivoluzionato la nostra comprensione della patogenesi della tubercolosi e ha anche fornito approfondimenti unici per comprenderne l'evoluzione.

9.1. METODI ATTUALI E MARCATORI GENETICI UTILIZZATI PER GLI STUDI EPIDEMIOLOGICI MOLECOLARI

La disponibilità di marcatori molecolari multipli e polimorfici all'interno dei genomi del MTB ha permesso sia di rilevare le catene di trasmissione della TB (studi epidemiologici) e sia di monitorare la diffusione regionale e globale dei ceppi MTB (studi filogenetici). Il marcatore molecolare ideale deve soddisfare i seguenti criteri (i) variabilità sufficiente per differenziare casi non correlati (ii) stabilità clonale soddisfacente per tracciare accuratamente le catene di trasmissione, (iii) robustezza per essere applicabile a un'ampia gamma di ceppi. La diversità genetica dell'MTB è di gran lunga superiore a quanto previsto in precedenza. Inserzioni/delezioni/duplicazioni e polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) sono la forza trainante della varianza genomica di MTB e molti di essi possono avere un impatto sul fenotipo.

In realtà, sono disponibili numerosi metodi molecolari per misurare la relazione genetica tra i ceppi MTB. Ogni metodo produce un profilo genetico definito "impronta digitale" o "genotipo" che è ceppo specifico. Questi strumenti di genotipizzazione classici hanno incluso, nel tempo, IS6110-RFLP, spoligotipizzazione basata su CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeats) e RD-LSP (Regions of Differences-Large Sequence Polymorphisms).

Questi metodi di tipizzazione hanno un potere discriminatorio intrinsecamente limitato poiché si basano su marcatori genetici polimorfici e interrogano meno dell'1% del genoma. Pertanto, non sono in grado di rilevare e risolvere completamente le catene di trasmissione recenti e spesso non riescono a distinguere ceppi geneticamente strettamente correlati. Queste limitazioni sono oggi superate dall'applicazione di strumenti di tipizzazione molecolare ad alta risoluzione basati sul sequenziamento dell'intero genoma (WGS) mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) [1].

L'ECDC considera il WGS la metodica standard per l'analisi dei cluster e richiede che ogni stato membro depositi nella piattaforma EPIPULSE i FastQ e i metadata di tutti i ceppi resistenti alla rifampicina eseguiti presso il laboratorio nazionale di riferimento. Ogni stato membro ha l'accesso alla piattaforma e può utilizzarla per l'analisi dei propri ceppi. Questo permette di tenere sotto controllo trasmissioni definite "Cross border" che interessano più stati membri. Nel caso di sospetto di un cross-border cluster, ECDC

allerta il national contact point degli stati membri coinvolti per le verifiche epidemiologiche e la messa in atto degli idonei meccanismi di controllo.

9.2. SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE PER LA GESTIONE DELLA TUBERCOLOSI

Il termine "sequenziamento di nuova generazione" (NGS) si riferisce a una serie di tecnologie utilizzate per sequenziare in modo massiccio frammenti di DNA. Oggi, le piattaforme NGS ampiamente utilizzate si basano sulla capacità di generare sequenze brevi (Illumina) o lunghe (Oxford Nanopore) con bassi tassi di errore che consentono di ottenere chiamate di varianti ad alta confidenza. Questo permette di identificare le mutazioni genomiche note come associate a farmaco resistenza e di identificare le differenze in singoli nucleotidi (SNPs), in regioni selezionate del genoma, che vengono utilizzate per l'analisi dei cluster. Ad oggi, le regioni ipervariabili vengono solitamente escluse dall'analisi bioinformatica utilizzata per l'identificazione dei cluster [1, 2].

9.3. SEQUENZIAMENTO INTERO VS MIRATO

La tecnologia WGS è sempre più conveniente; offre la massima risoluzione possibile per i grandi focolai di trasmissione di tubercolosi ed è uno strumento efficiente per tracciare le dinamiche di trasmissione nelle popolazioni umane senza ricorrere preventivamente a dati epidemiologici. Il problema principale rimane la scarsità di standardizzazione delle analisi e un limitato accesso a controlli di qualità. L'ECDC offre annualmente un controllo di qualità a tutti i laboratori nazionali di riferimento. I numeri bassi e i costi della strumentazione impongono una centralizzazione della tecnologia in pochi centri di riferimento.

Ad oggi, il WGS è eseguibile solo da ceppo isolato in coltura. È possibile utilizzare metodiche che utilizzano NGS da campione clinico applicando una strategia di amplificazione selettiva dei target di interesse (solitamente i geni associati alla farmacoresistenza o i markers di identificazione dei lineages) prima del sequenziamento [3].

Il flusso di lavoro standard per l'analisi WGS dei ceppi MTB (Figura 1) comporta la coltura di campioni di espettorato su terreni solidi (Löwenstein-Jensen) o liquidi (provette con indicatore di crescita dei micobatteri), l'estrazione del DNA dalle cellule batteriche, la preparazione della libreria e il sequenziamento utilizzando tecnologie di lettura breve (ad esempio, piattaforme Illumina) o tecnologie di lettura lunga (ad esempio, Oxford Nanopore). La pipeline di analisi MTB WGS completa prevede diversi passaggi chiave, come la convalida dei dati di input e il controllo di qualità seguiti dalla mappatura a un genoma di riferimento (spesso ceppo *M. tuberculosis* H37Rv) e dal rilevamento di varianti genomiche (SNP, inserzioni o delezioni (indels)) [1, 2]. Attualmente esistono numerose pipeline per MTB, senza un unico gold standard. Queste pipeline in genere escludono circa il 10% del genoma perché la mappatura errata in alcune regioni determina false chiamate di varianti (famiglie di geni PE e PPE, altri geni ripetitivi ed elementi genetici mobili) e applicano vari criteri, come profondità di lettura, qualità di base e "codon usage" bias, per filtrare le varianti false positive. Infine, sulla base delle varianti rilevate, possono essere eseguite diverse attività, tra cui (ma non limitate a) la previsione della resistenza ai farmaci e dei profili di suscettibilità, la tipizzazione dei ceppi e l'identificazione dei cluster di trasmissione [1, 2].

I profili di resistenza e di suscettibilità ai farmaci possono essere determinati con elevata precisione per molti farmaci utilizzati per il trattamento della tubercolosi [4], confrontando le "chiamate" delle varianti con elenchi di varianti che conferiscono resistenza ad alta affidabilità; p.es. l'analisi di oltre 10.000 isolati di MTB raccolti da 16 paesi in sei continenti e rappresentando tutti i principali lignaggi di MTB suggerisce che il sequenziamento dell'intero genoma può ora caratterizzare i profili di suscettibilità ai farmaci antitubercolari di prima linea con un grado di accuratezza sufficiente per l'utilizzo clinico [5]. Inoltre, questi risultati mostrano è possibile evitare l'esecuzione dell'antibiogramma per i farmaci antitubercolari di prima linea sui ceppi wild-type; questo porterebbe ad un grosso risparmio economico.

Questi elenchi sono stati stilati principalmente utilizzando associazioni genotipo-fenotipo identificate da analisi statistiche e sulla base dell'esito clinico. Nel 2021, l'OMS ha sviluppato un catalogo di mutazioni identificate in MTB e ne ha definito l'associazione con la resistenza fenotipica ai farmaci antitubercolari [6]. Il catalogo fornisce uno standard di riferimento per l'interpretazione delle mutazioni che conferiscono resistenza a tutti i farmaci di prima linea e a vari farmaci di seconda linea (nuova versione attesa nel 2023). Il catalogo 2021 riassume l'analisi di oltre 38.000 isolati con dati abbinati sul sequenziamento dell'intero genoma e sui test di sensibilità ai farmaci fenotipici provenienti da oltre 40 paesi per 13 farmaci anti-TB. Elenca oltre 17.000 mutazioni, la loro frequenza e l'associazione con, o meno, la resistenza. Tuttavia, questa prima versione del catalogo ha alcune limitazioni in quanto non prende in considerazione le doppie mutazioni, le mutazioni a frequenza molto bassa e il livello di MIC indotto dalla mutazione [6]. Per superare queste limitazioni è attualmente in preparazione la 2ª versione del catalogo che verrà rilasciata nel 2023. La tabella 1 indica i determinanti genetici valutati per la stesura del catalogo WHO 2023.

L'identificazione della resistenza alla bedaquilina è un esempio di come sia necessario un doppio approccio genotipo/fenotipo per la corretta interpretazione del dato. Il test fenotipico è complesso per le caratteristiche stesse del farmaco e la determinazione della MIC è preferibile rispetto al test alla concentrazione critica. Il meccanismo di resistenza alla bedaquilina può essere sul bersaglio, nel gene atpE o "off target". Le mutazioni in atpE inducono alti livelli di resistenza e sono facilmente identificabili con sequenziamento e test fenotipico alla concentrazione critica [7]. Sono però rare perché diminuiscono la fitness del ceppo che le accumula. Le mutazioni "off target" sono invece mutazioni in un soppressore della pompa di efflusso mmplS5-mmplL5 (Rv0678) [8]. Queste si distribuiscono su tutto il gene e non tutte hanno lo stesso impatto sulla MIC. Alcune mutazioni non conferiscono resistenza (neutre), mentre altre sono mutazioni borderline che hanno modesto effetto sulla sovraespressione delle pompe di efflusso mentre il terzo gruppo di mutazioni porta alla completa perdita di funzione (LOF) del soppressore e di consequenza la massima sovraespressione della pompa di efflusso mmplS5-mmplL5. Inoltre, è stato dimostrato che alcuni sottogruppi di MTB possono essere più suscettibili a particolari antibiotici a causa del loro specifico background genetico. Ad esempio, è stato dimostrato che mutazioni LOF in mmpL5 che sono rare a livello globale ma possono essere frequenti in alcune sottolinee di MTB (1.1.1.1 e 4.6), le rendono ipersensibili a bedaquilina (BDQ) e clofazimina (CFZ) [8].

9.4. WGS PER IDENTIFICAZIONE DEI LINEAGES E DEFINIZIONE DELLE TRASMISSIONI

La classificazione dei sette principali lineages associati all'uomo, di quelli associati agli animali e le loro sottolinee possono essere derivati direttamente dalle chiamate delle varianti utilizzando elenchi di SNPs che definiscono il lineage. Questo permette di studiare la struttura della popolazione e le potenziali differenze fenotipiche tra i lineages e confrontare gli isolati a livello globale.

I dati genomici per una serie di isolati possono essere utilizzati anche per indagini di sorveglianza e trasmissione. Per questo, l'approccio più comune consiste nell'utilizzare un metodo di clustering basato su cut-off SNP che inizia costruendo un elenco di SNP ad alta affidabilità e non ambigui trovati in ciascun isolato, spesso escludendo "indel" e siti correlati alla resistenza ai farmaci. Questo "filtraggio" è importante quando vengono utilizzate soglie di distanza SNP predefinite per raggruppare ceppi e definire catene di trasmissione recenti. Data la diversità genetica molto bassa del MTB, vengono spesso utilizzate soglie di 5 o 12 SNPs per suggerire collegamenti epidemiologici, sebbene queste soglie siano state calibrate in contesti a bassa incidenza con una popolazione di ceppi diversa [1, 2]. Non è ancora chiaro se un'unica soglia possa essere utilizzata per rilevare casi epidemiologicamente collegati in tutti i tempi e contesti.

9.5. TARGETED NGS

associazione

Contrariamente al WGS, l'NGS mirato (tNGS) può essere eseguito su campioni clinici diretti [9]. Ad oggi è l'opzione più rapida (2-3 giorni) per avere dati clinicamente utili su materiali raccolti da pazienti in cui si sospetta una TB MDR [9, 10] (Figura 2) e che ne può migliorare gestione clinica. Tuttavia, tNGS fornisce informazioni solo su una frazione limitata del genoma. I test tNGS commerciali attualmente disponibili sequenziano un numero limitato di regioni genomiche (6 o 18 geni (comprese alcune regioni promotrici)) associate rispettivamente alla resistenza a 7 o 13 farmaci antitubercolari) [10]. Il test permette di evitare la selezione indotta in vitro dalla coltura e di identificare la eteroresistenza. La figura 2 mostra il possibile flusso di lavoro e la figura 3 mostra i risultati di tre diverse corse. Nella legenda della figura 3 è spiegato come interpretarli. Nella Tabella 2 confronto tra WGS e tNGS.

Tabella 1 - Geni con mutazioni associate al fenotipo di resistenza:

Gruppo 1 mutazioni più frequenti,

Gruppo 2 mutazioni più rare

Farmaco	Gruppo 1	Gruppo2	
INH	ahpC, inhA, katG	mshA, ndh, Rv1258c, Rv2752c	
RIF	rpoB	rpoA, rpoC, Rv2752c	
EMB	embA, embB, embC, ubiA	embR,	
PZA	pncA, clpC1, panD	rpsA,	
FQ	gyrA, gyrB	None	
BDQ	pepQ, Rv0678, mmpL5, mmpS5, atpE	Rv1979c	
LZD	rplC, rrl	None	
CFZ	pepQ,Rv0678,mmpL5,mmpS5,Rv1979c	None	
DLM	fgd1, ddn, fbiA, fbiB, fbiC, Rv2983	ndh	
AMI	rrs, eis, whiB7	whiB6, ccsA, fprA, aftB	
STM	rrs, rpsL, gid, whiB7, Rv1258c	whiB6	
ETH	inhA, ethA, mshA	ethR, Rv3083, ndh	
KAN	rrs, eis, whiB7	None didne	
CAP	rrs, tlyA	whiB6, ccsA, fprA, aftB	



clinici italiani

Possibile algoritmo per Whole genome sequencing (WGS)

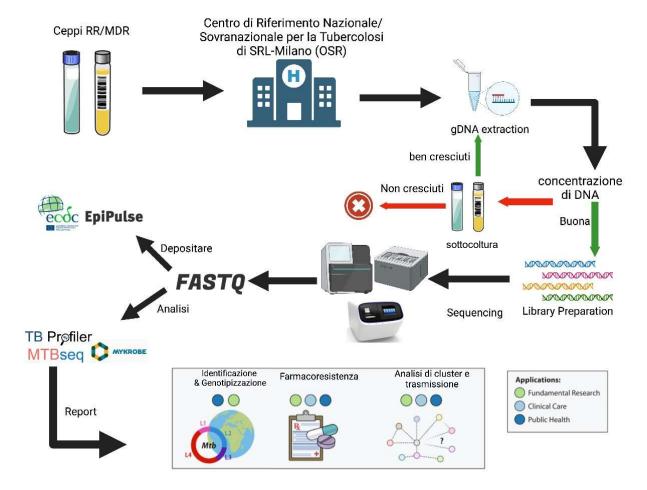


Figura 1 - Una pipeline semplificata per WGS include: la raccolta di ceppi (coltura liquida e solida), l'estrazione del DNA, preparazione della libreria, sequenziamento e analisi bioinformatica per il rilevamento delle varianti che consente l'identificazione MTB a livello di lineage e sublineage, la previsione della resistenza e l'analisi della correlazione. Dopo la raccolta del campione dal paziente, solitamente un espettorato, il passaggio successivo consiste nell'effettuare la coltura in terreni solidi o liquidi per 3-4 settimane fino a quando il numero di batteri è sufficiente per ottenere una buona quantità di DNA attraverso l'estrazione. Il DNA estratto dall'isolato di coltura viene quindi sottoposto a un protocollo di preparazione della libreria fino a quando non è pronto per la piattaforma di sequenziamento scelta. L'analisi bioinformatica finale di solito consiste nel mappare le letture ottenute in una sequenza di riferimento e nell'identificare le varianti. Se queste varianti sono presenti nei database di resistenza, vengono generate previsioni del profilo di resistenza.

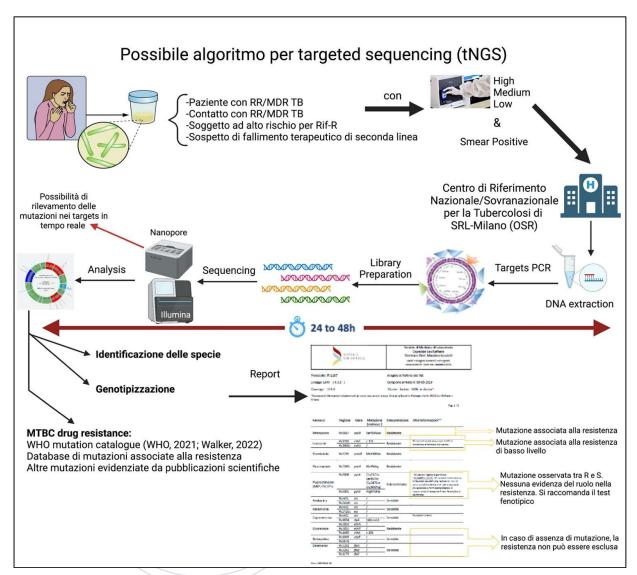


Figura 2 – Flusso di lavoro semplificato per eseguire tNGS. Dopo la raccolta del campione dal paziente, solitamente un espettorato, il campione viene sottoposto direttamente all'estrazione del DNA. Il passaggio successivo è l'amplificazione mediante PCR dei bersagli. Segue la preparazione della libreria per il sequenziamento. La preparazione è specifica per la piattaforma utilizzata. L'analisi bioinformatica finale di solito consiste nel mappare le letture ottenute in una sequenza di riferimento e nell'identificare le varianti. Se queste varianti sono presenti nei database di resistenza, vengono generate previsioni. Le varianti sono utilizzate anche per la determinazione delle specie o sottospecie di isolati di *M. tuberculosis* complex e per la genotipizzazione.

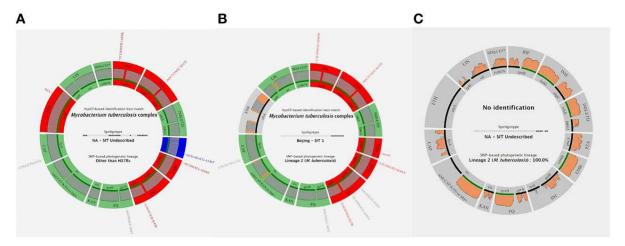


Figura 3 - Tre esempi di risultati tNGS ottenuti con il kit Deeplex (Genoscreen) su piattaforma illumina (A) tNGS interpretabile su tutti i target. (B) Risultato tNGS riuscito con delezione in ethA. (C) Risultato Deepplex tNGS non interpretabile. La migliore corrispondenza dell'identificazione basata su hsp65, lo spoligotipo e l'identificazione del lignaggio basata su SNP sono mostrati al centro della mappa. I loci target vengono visualizzati in gruppi, a seconda dell'antibiotico o degli antibiotici interessati: rpoB per rifampicina (RIF); katG-ahpC per isoniazide (INH); inhA-fabG1 per INH ed etionamide (ETH); pncA per pirazinamide (PZA); embB per etambutolo (EMB); rpsL-gidB per streptomicina (SM); qvrA-qvrB per fluorochinoloni (FQ); eis per kanamicina (KAN); rrs per amikacina, capreomicina e kanamicina (AMI-CAP-KAN); tlyA per CAP, ethA per ETH, rplCrrl per linezolid (LNZ); e rv0678 per bedaquilina e clofazimina (BDQ-CFZ). Gli alleli wildtype sono mostrati in verde, gli alleli mutati con mutazioni legate alla resistenza in rosso e le varianti non caratterizzate in blu (blu scuro se l'SNV è fisso, azzurro se l'SNV non è fisso). Il colore grigio indica che manca più del 5% del locus (ad esempio, in ethA in B). Le profondità di sequenziamento sono indicate sopra il cerchio che rappresenta i geni amplificati, colorate in grigio se la profondità di lettura è >100× in media, e in arancione se la profondità di lettura è <100× in media. Le linee piene mostrate sopra i nomi dei loci sono colorate in base all'efficienza di amplificazione di ciascun gene: verde se è stato sequenziato >95% del locus e nero se è stato sequenziato <95% del locus. Ogni variante è indicata con il codone di riferimento, il numero del codone e il codone alternativo, seguiti dall'amminoacido di riferimento, dalla posizione dell'amminoacido e dall'amminoacido mutato [9].

Tabella 2 - WGS vs tNGS

Vantaggi e svantaggi dell'approccio WGS e target NGS per la diagnosi rapida di malattia tubercolare

Vantagai			
	/antaggi		
WGS	tNGS		
TAT rapido se paragonato a coltura+	TAT (Turn Around Time) più rapido che per		
antibiogramma	WGS		
Costo (il costo è ammortizzato dai dati	Costi (più basso e rapido rispetto a AST		
forniti: antibiogramma molecolare,	completo fenotipico, più caro rispetto a		
analisi di cluster)	WGS)		
Analizza l'intero genoma e identifica	Maggiore sensibilità per l'alto coverage dei		
mutazioni che potrebbero diventare	geni di interesse		
rilevanti per nuovi antibiotici	g		
The rain and the arrangement	Analizza solo i geni amplificati: selezione a		
Da informazioni sui cluster	priori		
Permette di studiare nuove mutazioni	Da campioni diretti: mancanza di fase di		
o nuovi meccanismi di resistenza	coltura (migliore biosicurezza e logistica)		
È possibile eseguire sequenze di	Interpretazione "user-friendly" dei dati di		
letture brevi o lunghe	sequenziamento		
	Basato su Kit C 1 Q Z 1 O N E		
Sfide da risolvere	microbiologi		
Richiede una coltura positiva	Costo dell'amplificazione		
Supporto bioinformatico e storage dei	Costo efficacia? Corsa singola?		
dati			
Costi iniziali	Standardizzazione, controllo di qualità		
Standardizzazione	Mancanza di target rilevanti		
Richiede una banca dati di confronto			

BIBLIOGRAFIA 9

- 1. Meehan, C.J., Goig, G.A., Kohl, T.A. *et al.* Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat Rev Microbiol* 17, 533–545 (2019).
- 2. Dookie, N., Khan, A., Padayatchi, N. & Naidoo, K. Application of Next Generation Sequencing for Diagnosis and Clinical Management of Drug-Resistant Tuberculosis: Updates on Recent Developments in the Field. *Frontiers in Microbiology* 13, (2022).
- 3. Cabibbe, A. M., Walker, T. M., Niemann, S. & Cirillo, D. M. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis. Eur Respir J* 52, 1801163 (2018).
- 4. Gröschel, M.I., Owens, M., Freschi, L. *et al.* GenTB: A user-friendly genome-based predictor for tuberculosis resistance powered by machine learning. *Genome Med* 13, 138 (2021)
- 5. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *N Engl J Med* 379, 1403–1415 (2018).
- 6. Walker, T.M., et al. The 2021 WHO catalogue of Mycobacterium tuberculosis complex mutations associated with drug resistance: a genotypic analysis The Lancet Microbe 3, e265-e273 (2022).
- 7. Ghodousi, A. *et al. In vivo* microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* and transient emergence of *atpE_*Ala63Pro mutation during treatment in a pre-XDR TB patient. *Eur Respir J* 59, 2102102 (2022).
- 8. Merker, M., Kohl, T.A., Barilar, I. *et al.* Phylogenetically informative mutations in genes implicated in antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Genome Med*12, 27 (2020).
- 9. Jouet, A., Gaudin, C., Badalato, N., *et al.*. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. Eur Respir J. 2021 Mar 18;57(3):2002338.
- 10. Dookie, N., Khan, A., Padayatchi, N. & Naidoo, K. Application of Next Generation Sequencing for Diagnosis and Clinical Management of Drug-Resistant Tuberculosis: Updates on Recent Developments in the Field. *Frontiers in Microbiology* 13, (2022).

10. Annesso 9 - LA SICUREZZA NEL LABORATORIO DI MICOBATTERIOLOGIA

Il laboratorio di micobatteriologia costituisce un ambiente di lavoro dove, per la pericolosità dei materiali processati, le attrezzature usate e la complessità delle attività che vi si svolgono, deve essere posta una particolare attenzione alla tutela della salute e alla sicurezza degli operatori sanitari [1, 2].

Il Decreto Legislativo N° 81 del 9 aprile 2008, che raccoglie le direttive riguardanti la sicurezza ed i principi base per le misure di prevenzione e di protezione del rischio di incidenti ed infortuni nell'ambiente di lavoro, contiene nel titolo VIII le norme riguardanti il rischio di esposizione ad agenti biologici e classifica *Mycobacterium tuberculosis* nel gruppo 3 (Tabella 1). Nell'allegato XII vengono inoltre elencate le specifiche per le misure di contenimento (Tabella 2).

L'alta infettività di *M. tuberculosi*s è correlata alla bassa dose infettante nell'uomo (50% della dose infettante <10 bacilli). L'incidenza dell'infezione tubercolare, fra il personale di laboratorio, è stimata essere da tre a cinque volte maggiore di quella di un individuo che svolge un qualsiasi altro lavoro [1, 2].

La formazione di aerosol, in seguito alla manipolazione di campioni o colture, è il più importante fattore di rischio di infezione da *M. tuberculosis* per il personale di laboratorio. L'infezione può verificarsi anche attraverso lesioni o ferite cutanee. Il contatto diretto con la cute o con le mucose, l'ingestione o l'accidentale inoculo parenterale rappresentano i principali rischi di laboratorio associati alla manipolazione di materiali o colture contenenti micobatteri non tubercolari.

L'infezione è correlata alla concentrazione e alla virulenza dell'agente infettante, alla via di esposizione e alla ricettività dell'ospite.

È prescritta la sorveglianza sanitaria da parte del medico competente, che preveda appropriate misure di valutazione, monitoraggio ed eventualmente di trattamento, degli operatori esposti a rischio.

Vengono riportate di seguito le vie di penetrazione e le relative attività lavorative che possono esporre al rischio di infezione [3].

10.1. MODALITÀ DI CONTAGIO

Inalazione: attività lavorative che generano aerosol.

Uso di anse. Strisciare l'ansa su un terreno di coltura, soprattutto se la superficie è ruvida, stendere del materiale sulla superficie di un vetrino. Uso improprio delle pipette. Mescolare sospensioni batteriche, scaricare la pipetta su una superficie rigida. Uso di aghi e siringhe. Espellere aria da tubi o bottiglie contenenti colture, ritirare l'ago dal tappo in gomma di un flacone, separare l'ago dalla siringa sotto pressione. Centrifugazione di materiale infetto, soprattutto quando si verifica un danno ai contenitori. Uso di miscelatori, omogeneizzatori, sonicatori, agitatori e vortex su campioni clinici o colture. Travaso di liquidi contenenti materiale infetto. Aprire contenitori dei terreni di coltura, liofilizzare e filtrare sotto vuoto.

Gli aerosol contaminano persone, superfici, strumenti e canali di aerazione.

Ingestione: attività lavorative correlate alla trasmissione orale.

Porre materiale contaminato, o dita, in bocca. Mangiare, bere, usare rossetto o fumare nelle aree di lavoro.

Inoculazione: attività correlate a trasmissione intravenosa diretta o sottocutanea.

Manipolare aghi e siringhe. Maneggiare vetri rotti, bisturi e altri oggetti appuntiti o taglienti.

Inoculazione: attività correlate alla contaminazione della cute e delle mucose.

Schizzare o rovesciare materiale infetto negli occhi, bocca, naso e sulla pelle. Esporre cute non intatta a materiale contaminato. Lavorare su superfici contaminate. Maneggiare equipaggiamento contaminato. Manipolare non correttamente campioni o colture con anse, aghi da inoculo o tamponi.

10.2. PROCEDURE E PRATICHE MICROBIOLOGICHE STANDARD

Una corretta tecnica microbiologica e l'adozione di precauzioni universali sono essenziali per la sicurezza in laboratorio [3, 4]. Tutti i campioni biologici devono essere considerati infetti e devono pervenire in laboratorio in contenitori di sicurezza, ben separati dall'eventuale modulo di richiesta. Il personale di laboratorio deve avere una specifica preparazione nella manipolazione di materiali contenenti micobatteri e deve indossare quanti e barriere di protezione facciale per prevenire la possibilità di contaminazione da schizzi di materiale. È fondamentale lavare le mani dopo aver maneggiato materiali infetti e prima di lasciare il laboratorio. Nelle aree di lavoro deve essere vietato fumare, consumare cibo e bevande, conservare alimenti nei frigoriferi e applicare cosmetici, portare oggetti alla bocca. Le persone che portano lenti a contatto devono munirsi di occhiali di protezione o barriere di protezione facciale. Il laboratorio va tenuto pulito, in ordine e sgombro da gualsiasi oggetto non pertinente al lavoro. Minimizzare tutte le procedure che possono creare aerosol (vedi sopra). Le superfici di lavoro devono essere decontaminate dopo qualsiasi versamento di materiali potenzialmente pericolosi ed alla fine di ogni giorno di lavoro. Tutti i campioni, le colture e i materiali contaminati devono essere sterilizzati prima di essere eliminati o, se riutilizzabili, prima di essere sottoposti a lavaggio (con soluzione acquosa di ipoclorito di sodio per uso domestico diluita al 10% o altro disinfettante equivalente). Tutto il materiale da eliminare deve essere posto in sacchi di plastica a tenuta per essere autoclavati o inceneriti sul posto. I rifiuti destinati ad essere rimossi dal laboratorio devono essere posti in contenitori rigidi a tenuta.

10.3. PRATICHE SPECIALI

Sulla porta del laboratorio di micobatteriologia deve essere esposto il simbolo internazionale di rischio biologico. L'accesso alle aree del laboratorio deve essere limitato alle persone autorizzate, che possiedano i necessari requisiti per l'ammissione. Le porte del laboratorio vanno tenute chiuse durante il lavoro [4].

Aghi e siringhe non devono essere usati come sostituti delle pipette nella manipolazione di fluidi infetti. In particolare gli aghi non devono essere reincapucciati, piegati o rimossi, ma depositati in appositi contenitori resistenti alla perforazione. Se necessario, usare siringhe ad ago fisso o con punte luer-lock.

Il fissaggio dei vetrini può non uccidere tutti i micobatteri eventualmente presenti sulla superficie e devono essere maneggiati con cura. Per essere certi che vengano uccisi tutti i micobatteri occorre aggiungere un'uguale volume di ipoclorito di sodio al 5% (candeggina per uso domestico) al campione biologico prima della preparazione del vetrino, ovviamente il campione così trattato non sarà utilizzabile per la coltura.

In caso di incidenti con sversamenti di colture micobatteriche è necessario evacuare l'area chiudendo le porte, ed attendere almeno 30 min per permettere all'aerosol di depositarsi. Per rientrare nella stanza sarà necessario dotarsi di maschera dotata di filtri ad alta efficienza. Il materiale sversato dovrà essere assorbito e disinfettato appena possibile (soluzione acquosa di ipoclorito di sodio, derivati del fenolo al 2.5 - 5%, alcool isopropilico al 70% o altra soluzione efficace). Devono essere presenti procedure scritte per il trattamento degli sversamenti di materiali infetti. Deve essere tenuta una registrazione scritta di tutti gli incidenti avvenuti in laboratorio. È raccomandata la decontaminazione periodica del laboratorio.

Gli strumenti di laboratorio che necessitano di riparazione devono essere decontaminati e puliti prima dell'intervento dei tecnici addetti alla manutenzione o riparazione o prima di essere inviati alle case costruttrici per eventuali riparazioni o restituzioni; in caso contrario devono essere contrassegnati con il simbolo di rischio biologico. Devono esistere indicazioni scritte riguardo ai disinfettanti usare per i vari scopi e la diluizione raccomandata per ciascuno di essi [7]. In tutte quelle procedure che comportino il rischio di contatto accidentale con sangue e materiali infetti, devono essere indossati guanti adeguati. Dopo l'uso, i guanti contaminati devono essere eliminati e mai riutilizzati, le mani devono essere lavate.

10.4. EQUIPAGGIAMENTO DI BIOSICUREZZA RACCOMANDATO

- Cappe di sicurezza biologica a flusso laminare tipo II, da usarsi ogni qualvolta si eseguano operazioni che possono liberare aerosol con conseguente rischio di infezione per via aerea, come apertura di contenitori dopo centrifugazione, miscelazione, agitazione, sonicazione e apertura di contenitori di materiali infetti. È di fondamentale importanza non ostruire la griglia di aspirazione del piano di lavoro con fogli, teli o apparecchiature. Le cappe di sicurezza proteggono dall'aerosol ma non dalla contaminazione cutanea. Per ogni cappa di sicurezza deve essere previsto un programma periodico di disinfezione, manutenzione e sostituzione dei filtri, con relativa registrazione.
- Centrifughe refrigerate, dotate di contenitori a tenuta, in grado di contenere l'aerosol prodotto in caso di rottura di una provetta. Le provette ed i provettoni per centrifuga devono avere tappi a vite. I contenitori devono essere aperti in cappa di sicurezza biologica. I contenitori, i rotori e l'interno delle centrifughe devono essere decontaminati regolarmente.
- Pipette ed anse per la processazione del campione. preferibile utilizzare materiale monouso, quindi è indicato l'uso di pipette Pasteur in plastica anziché in vetro, o l'utilizzo di pipettatori automatici. Sono preferibili anse monouso in plastica; in caso di anse riutilizzabili, per la sterilizzazione è indicato l'uso di uno sterilizza-anse elettrico, per ridurre la formazione di aerosol. Le anse possono essere infisse in un contenitore con sabbia ed una soluzione di fenolo al 5% o di alcool al 95% per rimuovere l'eccesso di inoculo prima dell'incenerimento.
- Barriere di protezione facciale (occhiali, maschera o visiera protettiva) necessarie per la manipolazione di materiali infetti fuori dalla cappa di sicurezza biologica.
- Provette e bottiglie con tappo a vite per conservare campioni e colture.
- Autoclave per sterilizzare i materiali contaminati.
- Indumenti monouso da indossare durante il lavoro, quali camici ad abbottonatura posteriore, copricapi, copriscarpe. Questi indumenti non vanno indossati in aree diverse dal laboratorio. Gli indumenti contaminati devono essere decontaminati con metodi

appropriati prima di essere lavati. Gli indumenti di laboratorio non vanno tenuti negli stessi armadi degli abiti normali.

- Le attrezzature dovrebbero essere progettate in modo tale da prevenire o limitare i contatti fra l'operatore e il materiale infetto. Devono esser prodotte con materiali impermeabili ai liquidi e resistenti alla corrosione. Devono inoltre soddisfare determinati requisiti strutturali: esser prive di punte o spigoli taglienti e di parti in movimento non protette, garantire semplicità d'uso e manutenzione, di pulizia e di decontaminazione [5, 6].ll datore di lavoro e/o il direttore del laboratorio, il responsabile della sicurezza, il medico competente ed i dirigenti devono informare gli operatori dei rischi specifici ai quali sono esposti ed istruirli sulle misure di sicurezza, fornendo un manuale operativo e di sicurezza riportante linee guida e protocolli per minimizzare o eliminare questi rischi. Devono inoltre assicurare la fornitura di strutture, strumentazioni e materiali adeguati e sorvegliare sul loro corretto utilizzo.
- i sistemi di sicurezza devono comprendere un sistema antincendio, un impianto elettrico di continuità, docce di emergenza e dotazioni per il lavaggio oculare.

Alla base della maggior parte dei rischi in laboratorio si trova l'errore umano, per mancanza di pratica, di informazione, distrazione o eccesso di confidenza; compromettendo l'efficacia delle migliori misure di sicurezza e delle apparecchiature destinate alla protezione dell'operatore. Sono oggi disponibili conoscenze tecniche e strumentali che consentono di prevenire la maggior parte delle infezioni in laboratorio [4].

• Una corretta progettazione strutturale del laboratorio e apparecchiature appropriate consentono di ridurre notevolmente il rischio di infezione in laboratorio, ed è quindi importante la loro corrispondenza funzionale con i criteri di sicurezza dettati dalla legislazione vigente. Pur non esistendo requisiti specifici per la ventilazione, questa dovrebbe essere regolata per consentire diversi ricambi d'aria ogni ora, con temperature tra 20 e 23°C e umidità dell'aria del 50-60%. L'aria dovrebbe poter essere estratta mediante filtri HEPA ed avere la possibilità di estrazione completa terminale ed immissione all'esterno dell'aria filtrata. Se non esiste aerazione meccanica, le finestre devono essere apribili e, preferibilmente, dotate di reti contro gli insetti.

10.5. IL LABORATORIO DI CONTENIMENTO 3

Un laboratorio di contenimento 3 comprende almeno un'anticamera e un laboratorio P3 vero e proprio. L'anticamera è a pressione negativa rispetto all'ambiente esterno ed il laboratorio è a pressione negativa rispetto all'anticamera. I ricambi di aria dovrebbero essere circa 10/h. Nel laboratorio generalmente una parte dell'aria ricircolata e la rimanente viene riversata all'esterno; tutta l'aria viene comunque filtrata mediante filtri HEPA. Tutte le porte sono munite di finestra di ispezione. L'autoclave è passante, ha cioè lo sportello di ingresso nel laboratorio e quello di uscita nell'anticamera. Nell'anticamera deve esser presente un pannello per la misurazione della depressione dell'anticamera rispetto all'esterno e del laboratorio rispetto all'anticamera. Vi si trovano anche il registro di accesso al laboratorio e l'elenco delle persone autorizzate a lavorarvi. É anche disponibile un manuale operativo di sicurezza che riporta le operazioni da effettuare sia nella routine lavorativa che in caso di incidente. Sulla porta esterna è esposto il simbolo internazionale di rischio biologico. Le porte esterna ed interna non possono mai essere aperte contemporaneamente.

Il laboratorio P3 contiene solitamente una o più cappe biologiche di classe II, una centrifuga refrigerata munita di contenitori di provette chiusi (anti-aerosol), termostati ed apparecchiature varie nonché un telefono.

Il laboratorio dovrebbe prevedere un sistema di disinfezione ambientale da impiegare a seguito di incidenti gravi ed anche a scadenze periodiche.

Il laboratorio P3, così come le apparecchiature contenute al suo interno, è sottoposto a controlli periodici (ogni 6 mesi) da parte di ditte specializzate.

Gli operatori del laboratorio P3 devono indossare indumenti monouso quali camici con apertura posteriore, doppi guanti, sovrascarpe, mascherine tipo FFP2 con efficienza del 95% per particelle di 0.3 µm di diametro (TB respiratory protection program in health care facilities, National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 1999, http://www.cdc.gov/niosh/99-143.html, e Guidelines for prevention of tuberculosis in health care Facilities in resource-limited settings, WHO/TB/99.269). Prima di uscire dal laboratorio P3 viene tolto il primo paio di guanti mentre i rimanenti dispositivi vengono eliminati nell'anticamera [6, 8].

BIBLIOGRAFIA 10

- 1. Baussano I, Williams B, Pivetta E, Bugiani M, Scano F. Tuberculosis among healthcare workers. Emerg Infect Dis 2011, 17:488–494.
- 2. Collins CH, Kennedy DA. Laboratory-acquired Infections: History, Incidence, Causes and Preventions, 4th edition. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1999
- 3. ECDC *Biosafety in the laboratory diagnosis of tuberculosis. In:* Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union. 2016.
- 4. ECDC, 'Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union Updated 2018
- 5. World Health Organization. Laboratory biosafety manual. 3rd edition.Geneva: WHO; 2004. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf.
- World Health Organization. Tuberculosis laboratory biosafety manual. Geneva: WHO;
 2012.. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf.
- 7. Best M., Sattar S.A., Springthorpe V.S., Kennedy M.E., *Efficacies of selected disinfectants against* Mycobacterium tuberculosis, 1990, J Clin Microbiol; 28:2234–2239.
- 8. Scarparo C., Riva R. *La sicurezza nel laboratorio di micobatteriologia*. In: Tortoli E., Piersimoni C., Scarparo C., Cirillo D. M., Frizzera E. Micobatteriologia Clinica. II Ed. 2013. C.E.A. Selecta Medica, Pavia.

11. Annesso 10 - TUBERCOLOSI IN ETÀ PEDIATRICA

La TB pediatrica (PTB) può essere considerata una sentinella della diffusione della malattia nella comunità. Inoltre, i bambini sono particolarmente a rischio di progressione verso forme di malattia attiva gravi e perfino mortali, e quelli con una infezione latente rappresentano un serbatoio potenziale di riattivazione della malattia in età adulta. La TB pediatrica necessita di un'identificazione tempestiva, infatti un miglioramento della sorveglianza da parte degli operatori sanitari e dei pediatri è importante per raggiungere una migliore conoscenza degli aspetti clinici distintivi della TB. Tale diagnosi, nei pazienti pediatrici, spesso viene effettuata in ritardo per mancanza di un sospetto epidemiologico.

La diagnosi di TB nei pazienti pediatrici è spesso difficile, perché l'infezione può essere asintomatica o presentare sintomi aspecifici e la malattia è generalmente paucibacillare. Le linee guida raccomandano di applicare ai pazienti pediatrici una combinazione dei diversi approcci disponibili: clinici, radiologici, immunologici e microbiologici, per aumentare la resa diagnostica. Dal punto di vista microbiologico, è stato suggerito un approccio diagnostico basato sul "multiple sampling", che consiste nella raccolta seriale (3 campioni prelevati in giorni consecutivi) di materiali biologici provenienti da diversi distretti corporei in base alla sospetta localizzazione.

Data la natura pauci-bacillare dei campioni prelevati dai pazienti pediatrici, la metodica di indagine microbiologica che può assicurare maggiore sensibilità, è rappresentata dalle tecniche di biologia molecolare.

I campioni clinici raccomandati dall'OMS per la diagnosi di TB polmonare nei bambini e negli adolescenti per i centri che utilizzano Xpert MTB/RIF o Ultra sono: espettorato o espettorato indotto, aspirati gastrici, aspirati nasofaringei e feci. Altri test molecolari per la diagnosi di PTB sono stati convalidati solo su campioni di espettorato [1].

Feci

Il campione di feci è una nuova matrice biologica raccomandata dall'OMS per la diagnosi di TB polmonare nei bambini, per i centri che utilizzano la piattaforma GeneXpert MTB/RIF o Ultra [2, 3]. Tale matrice può essere utilizzata come campione biologico alternativo, soprattutto in situazioni in cui è difficile ottenere campioni respiratori adeguati per la diagnosi di PTB, soprattutto nei bambini con età <5 anni. La ricerca del MTB sul campione fecale è sicuramente più accettabile e fattibile in determinati contesti, poiché non è una procedura invasiva.

I bambini con tubercolosi polmonare ingeriscono i bacilli della tubercolosi contenuti nell'espettorato, che poi passando attraverso il tratto digestivo possono essere rilevati nei campioni di feci. Le feci sono, quindi, considerate come campione respiratorio alternativo per la diagnosi di tubercolosi.

L'evidenza scientifica suggerisce che l'espettorato e l'aspirato gastrico sono le matrici biologiche di elezione per il rilevamento del MTB, ma la piattaforma GeneXpert MTB/RIF e Ultra hanno mostrato nei campioni di feci un'accuratezza diagnostica simile ai test eseguiti su campioni respiratori nei bambini, pur avendo il vantaggio di essere una matrice non invasiva [2, 3].

Campioni biologici approvati dall'OMS per la diagnosi della tubercolosi polmonare

Tipo di campione	Vantaggi	Svantaggi	Accettabilità del paziente e/o genitore
Espettorato	Basso costo Non invasivo	Non eseguibile in pazienti <5 anni	Alta
Espettorato indotto	Non invasivo (se seguito da espettorazione spontanea)	 Richiesta strumentazione, soluzione salina ipertonica e personale addestrato. Potrebbe richiedere ulteriore aspirazione nasofaringea nei bambini piccoli. Trasmissione mediante aerosol-rischio per gli operatori sanitari e altri 	Moderata
Aspirato gastrico	Fattibile nei bambini piccoli	-Invasivo-Richiede il digiuno-Richiede materiali di consumo e personale addestrato	Bassa
Aspirato nasofaringeo	Fattibile nei bambini piccoli Meno invasivo dell'aspirato gastrico	-Invasivo -Richiede attrezzature e personale addestrato -Trasmissione aerosol rischio per gli operatori sanitari e altri	
Feci	Non invasivo	Il campione va trattato in accordo con le procedure raccomandate nell' manuale WHO (operational handbook for childhood TB module 5)	Alta

Accuratezza diagnostica di Xpert MTB/RIF e Ultra nei diversi tipi di campioni pediatrici utilizzando come standard di riferimento l'esame colturale da campione respiratorio.

Tipo di campione	Sensibilità (SE)	Specificità (SP)		
XPERT MTB/RIF				
Espettorato	0.65	0.99		
Aspirato gastrico	0.73	0.98		
Aspirato nasofaringeo	0.46	1.00		
Feci	0.61	0.98		
Feci (in pazienti HIV- positive)	0.70	0.98		
XPERT ULTRA				
Espettorato	0.73	0.97		
Aspirato gastrico	0.64	0.95		
Aspirato nasofaringeo	0.46	0.98		
Feci	0.53	0.98		



associazione microbiologi clinici italiani

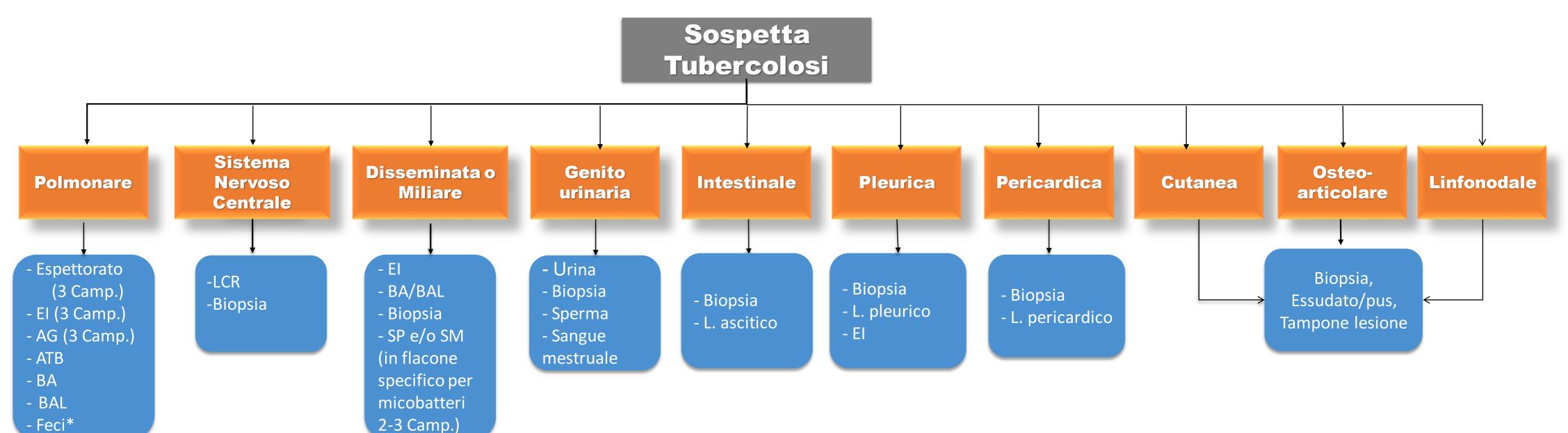
Ente del Terzo Settore

BIBLIOGRAFIA 11

- 1. Practical manual of processing stool samples for diagnosis of childhood TB. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 2. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 5: management of tuberculosis in children and adolescents. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 3. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021 (https://apps.who.int/iris/ handle/10665/342331, accessed 1 December 2021).

Tubercolosi diagnosi microbiologica

1 - Fase pre-analitica



* Feci (soggetti provenienti da paesi ad alta endemia, bambini o anziani).

ABBREVIAZIONI

AG: Aspirato gastrico

ATB: Aspirato trans-bronchiale

BA: Broncoaspirato

BAL: Lavaggio bronco-alveolare

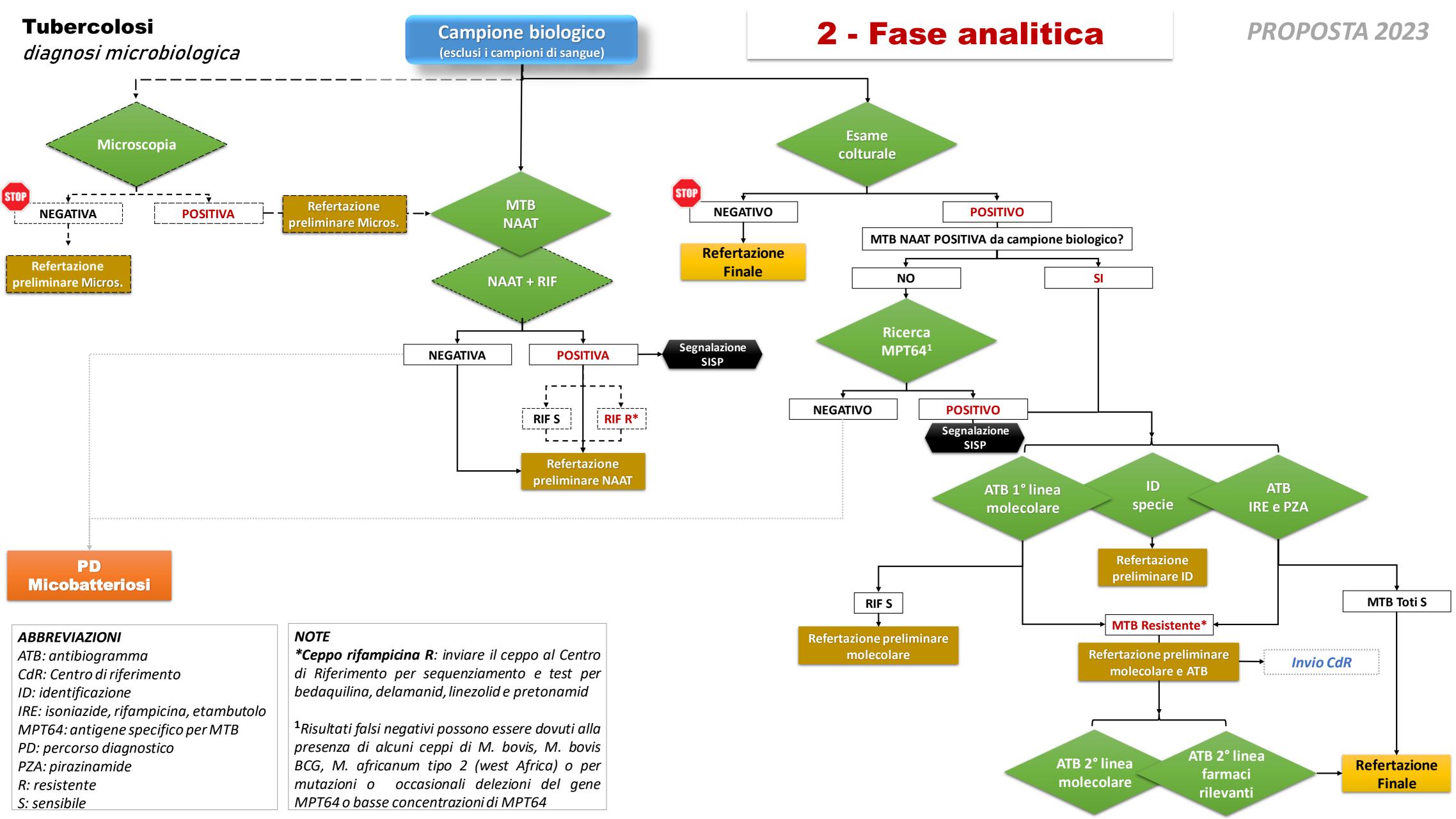
Camp.: Campioni

EI: Espettorato indotto

LCR: Liquido cefalo-rachidiano

SM: Sangue midollare SP: Sangue periferico

NOTE



Tubercolosi

diagnosi microbiologica

NOTE

In caso di impossibilità del laboratorio di eseguire i test indicati, riferire il campione o il ceppo al centro di riferimento regionale.

1. Esame colturale per escludere sia la presenza di micobatteri che di altri batteri o funghi

La diagnostica microbiologica delle micobatteriosi è meno standardizzata rispetto alla diagnostica della tubercolosi, in caso di dubbi, si consiglia di rivolgersi a laboratori di riferimento con esperienza sugli NTM.

Per ulteriori chiarimenti fare riferimento al testo.

ABBREVIAZIONI

BAAR: bacilli alcool-acido resistenti

MTB: M. tuberculosis complex

NAAT: test di amplificazione degli acidi nucleici

PD: percorso diagnostico

2 - Fase analitica

