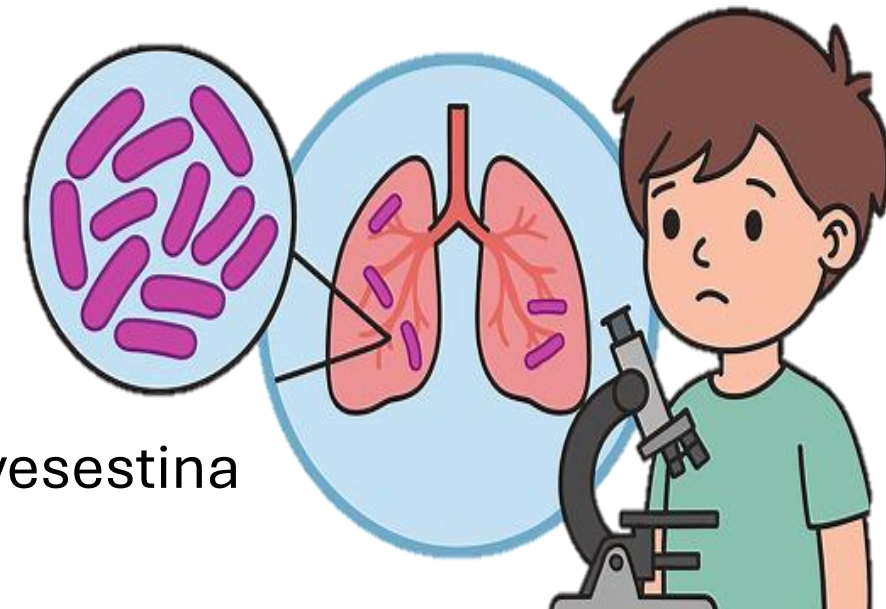


Percorso diagnostico e terapeutico della tubercolosi attiva e della infezione tubercolare

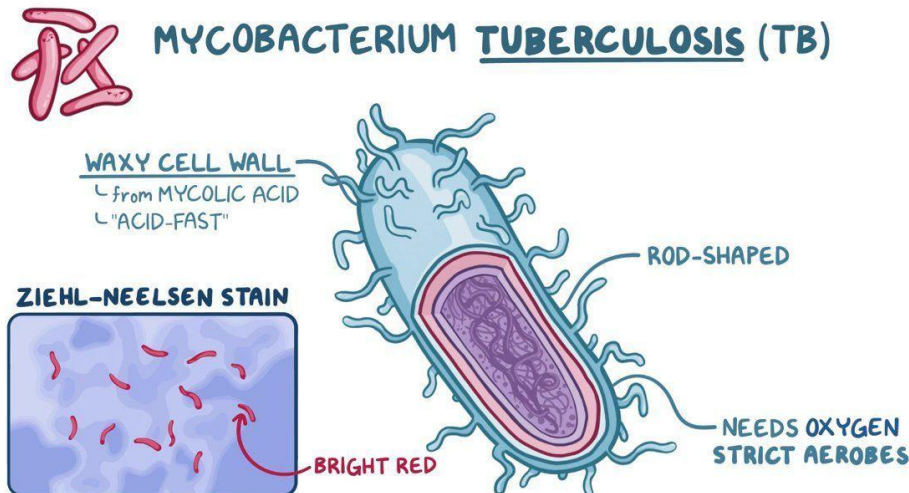
Prof. Vittorio Sambri
Università di Bologna

Unità Operativa di Microbiologia, Laboratorio Unico di Pievesestina
(FC)

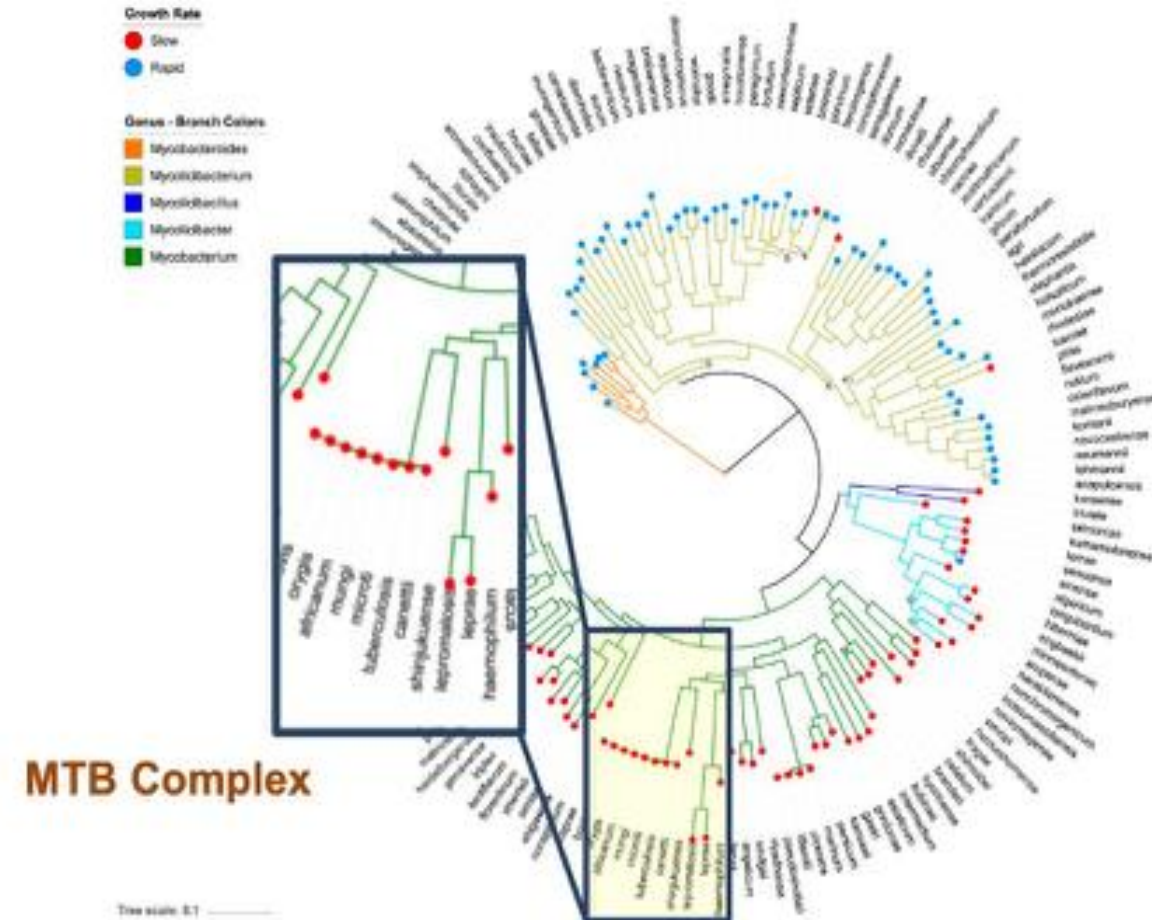


TBC: concetti di base

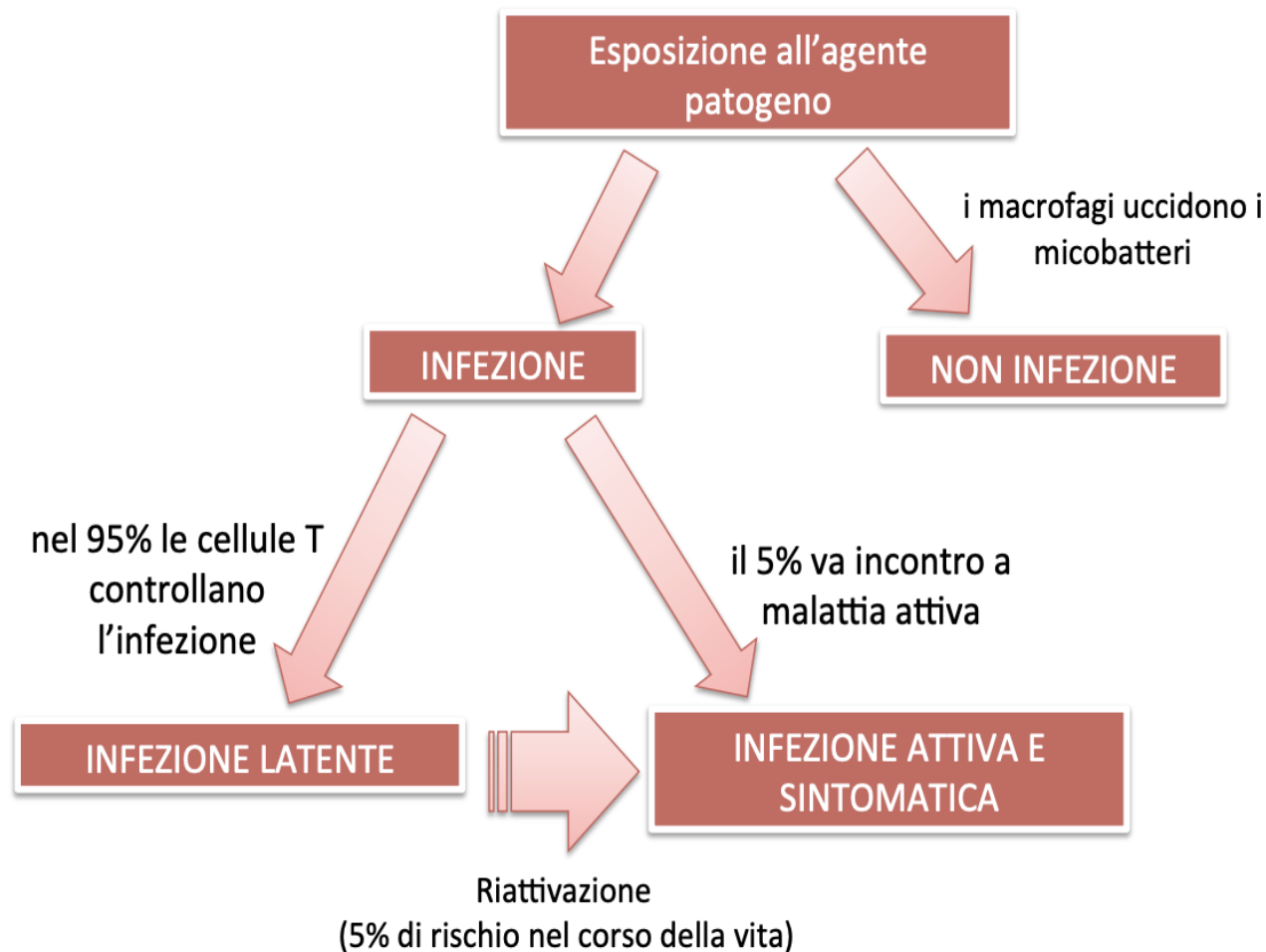
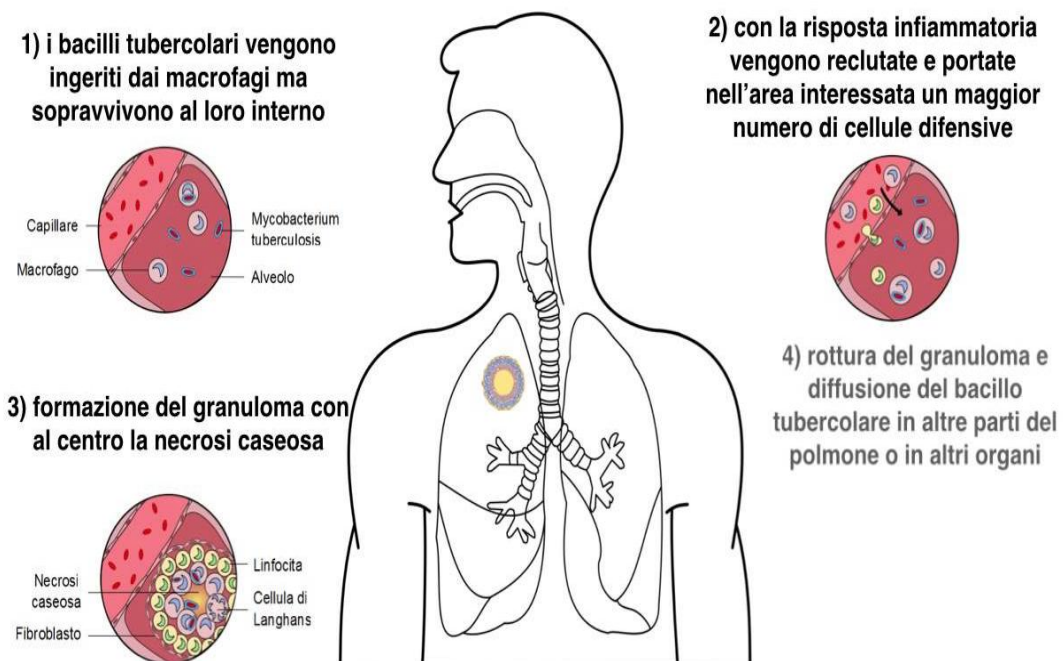
- *Mycobacterium tuberculosis*;
- Aerobio Gram positivo, alcol-acido resistente, bacillo a forma di bastoncino evidenziabile mediante colorazione di Ziehl-Nielsen;
- Molto resistente ad agenti chimici e fisici, se non esposto alla luce solare, può sopravvivere in ambiente esterno anche per alcuni mesi;
- Cresce e si moltiplica in maniera estremamente lenta (16-20 ore)



Phylogenetic tree of all well characterized *Mycobacterium* species.



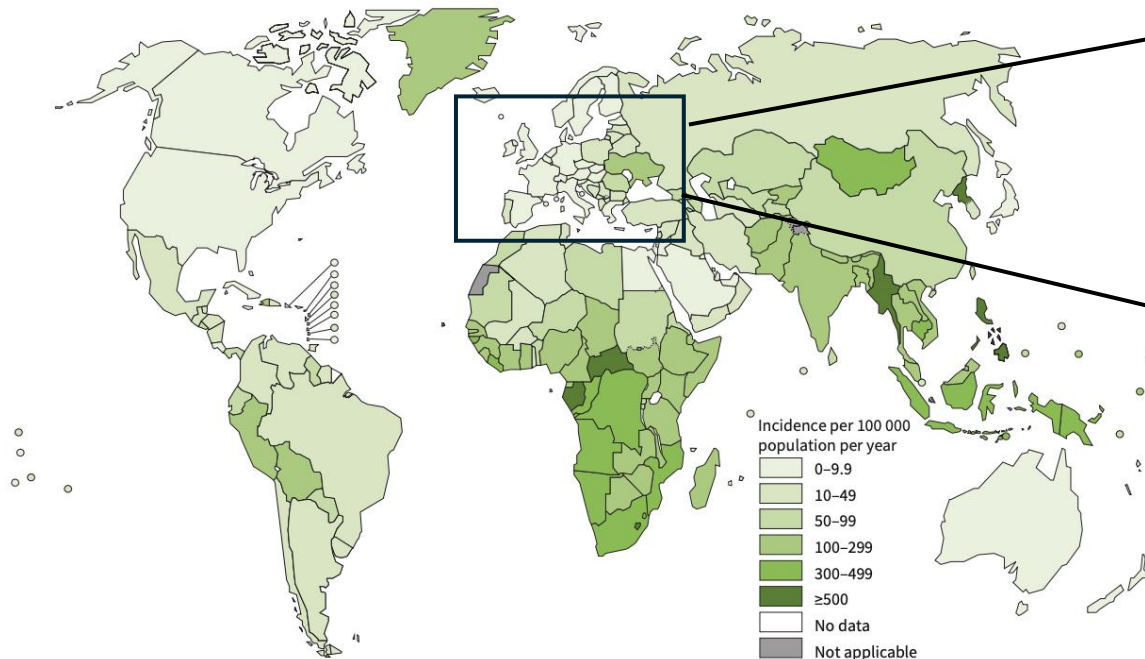
Patogenesi



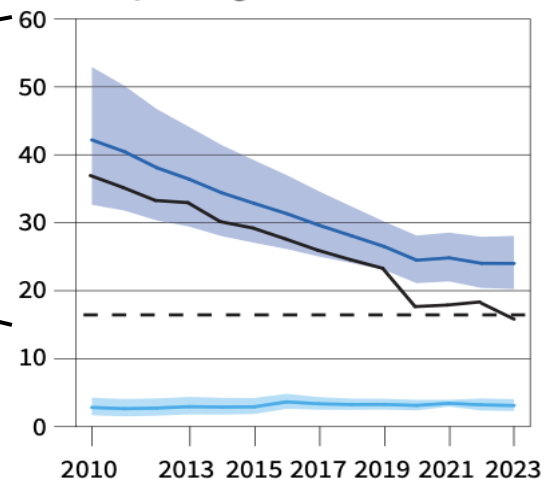
- 🛡️ Macrofagi e cellule dendritiche riconoscono PAMP tramite TLR, attivando citochine proinfiammatorie.
- 🔬 La fagocitosi può portare a necrosi, apoptosi o sopravvivenza del macrofago infetto.
- 🔄 *M. tuberculosis* può eludere la distruzione intracellulare.
- 🔍 Le cellule dendritiche attivano i linfociti T CD4+ nei linfonodi.
- 💥 IFN- γ e TNF- α sono cruciali per l'immunità e la formazione del granuloma.

Introduzione: La tubercolosi nel mondo e in Italia

Estimated TB incidence rates, 2023

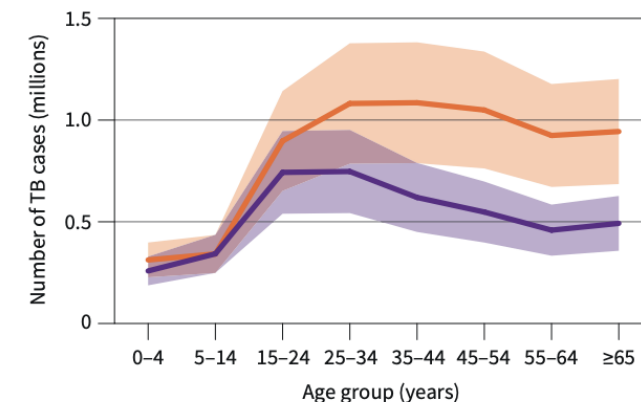


European Region



Andamento dei tassi stimati di incidenza della tubercolosi in Europa, 2010–2023 Il tasso complessivo di incidenza della tubercolosi è mostrato in **blu**, mentre il tasso di incidenza tra le persone che vivono con l'HIV è mostrato in **azzurro**. Le linee **nere** continue indicano le notifiche di casi di persone appena diagnosticate con tubercolosi, per confronto con le stime del tasso complessivo di incidenza.

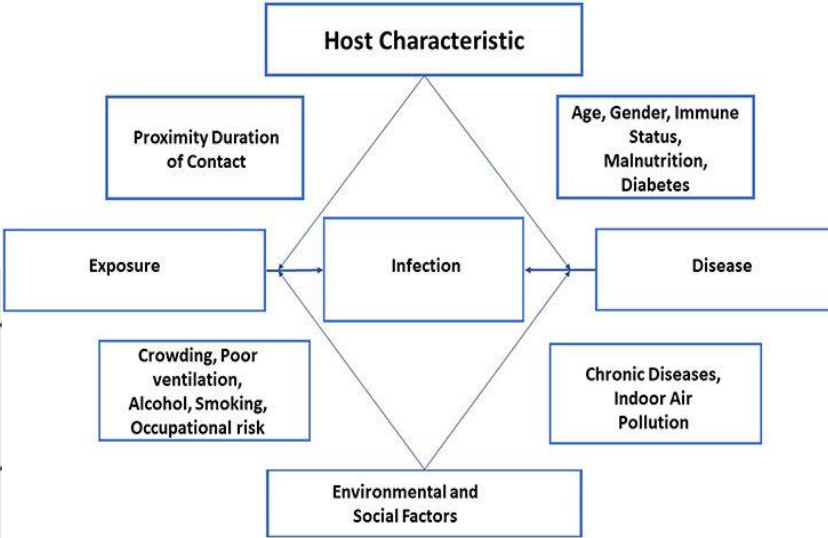
Global estimates of TB incidence disaggregated by age group and sex (female in purple; male in orange), 2023



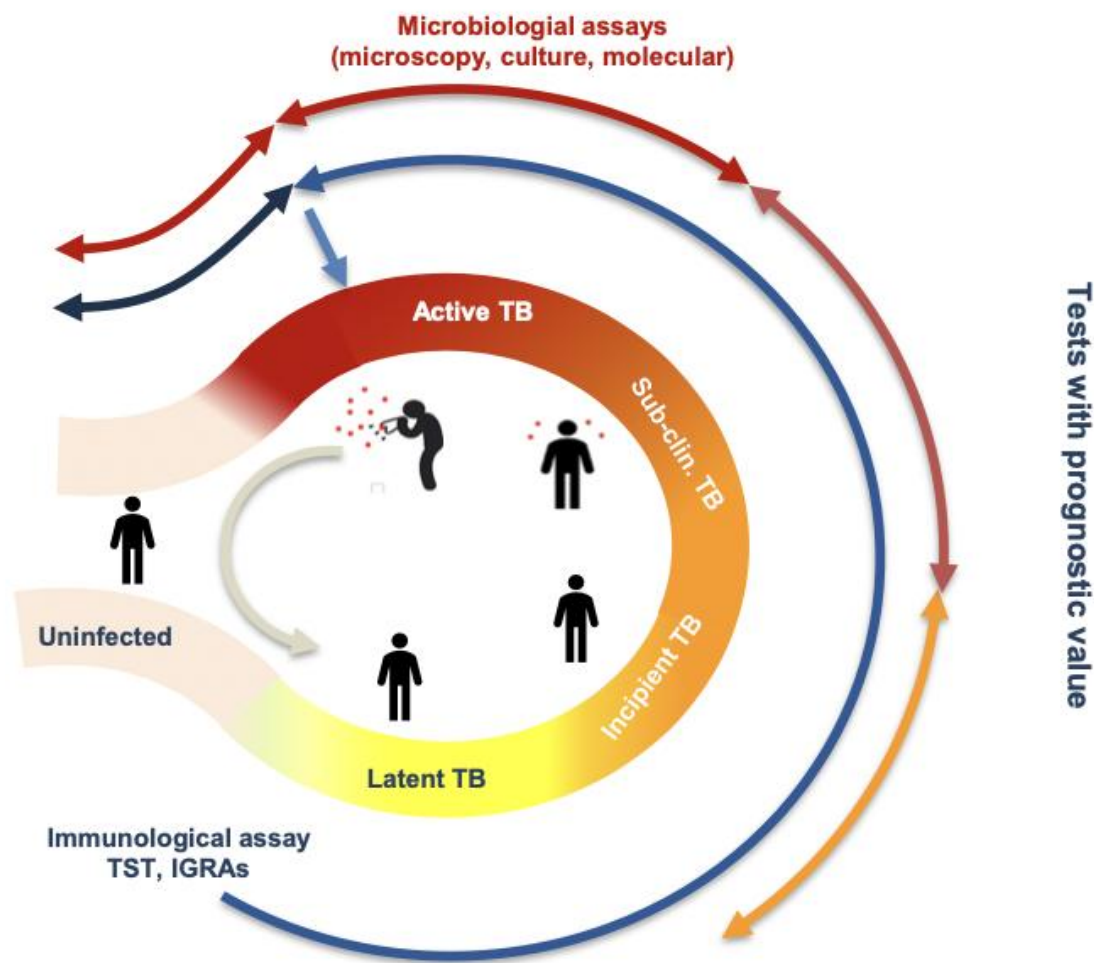
Nel 2023, il 55% delle persone che hanno sviluppato la tubercolosi erano uomini, il 33% donne e il **12% bambini e giovani adolescenti**.

Infezione vs malattia tubercolare attiva

| Features | Latent TB | Active TB |
|---------------------------------|---|--|
| Infectivity | Latent TB patients are unable to transmit the infection | People with active TB can spread the disease |
| Symptoms | No | Five major symptoms; cough lasting three or more weeks, coughing up blood, losing weight, night sweats, shortness of breath, and fever |
| Skin test | Positive | Positive |
| Interferon gamma release assay | Positive | Positive |
| Sputum acid-fast bacillus smear | Negative | Negative or positive |
| Chest radiography | Normal or stable calcified granulomas | Abnormal findings with active TB infections |
| Treatment | Conceder treatment to prevent progression to active TB | Isolation and drug regimen |



Percorso diagnostico: infezione vs malattia



| Category | Definition |
|------------------|---|
| Uninfected | A subject with no immunological sign of TB infection. Some highly exposed subjects remain TST or IGRA negative despite the presence of an adaptive immune response against TB and are defined as “resisters”. |
| Resisters | Subject highly exposed to Mtb that remain IGRA ⁺ TST ⁻ . Presence of Mtb specific antibodies, IFN γ CD4 ⁺ T cells (TH17) |
| Latent infection | LTBI “as having evidence of TB infection and no clinical, radiological or microbiological evidence of active TB disease” |
| Incipient TB | Incipient TB infection is an infection that is likely to progress to active disease in the absence of further intervention but has not yet induced clinical symptoms or radiographic abnormalities. |
| Sub-clinical TB | Subclinical TB disease is disease that does not cause clinical TB-related symptoms but causes other abnormalities that can be detected using existing radiologic or microbiologic assays |
| Active TB | Active TB as “symptomatic patients with radiological or microbiological evidence of Mtb” |

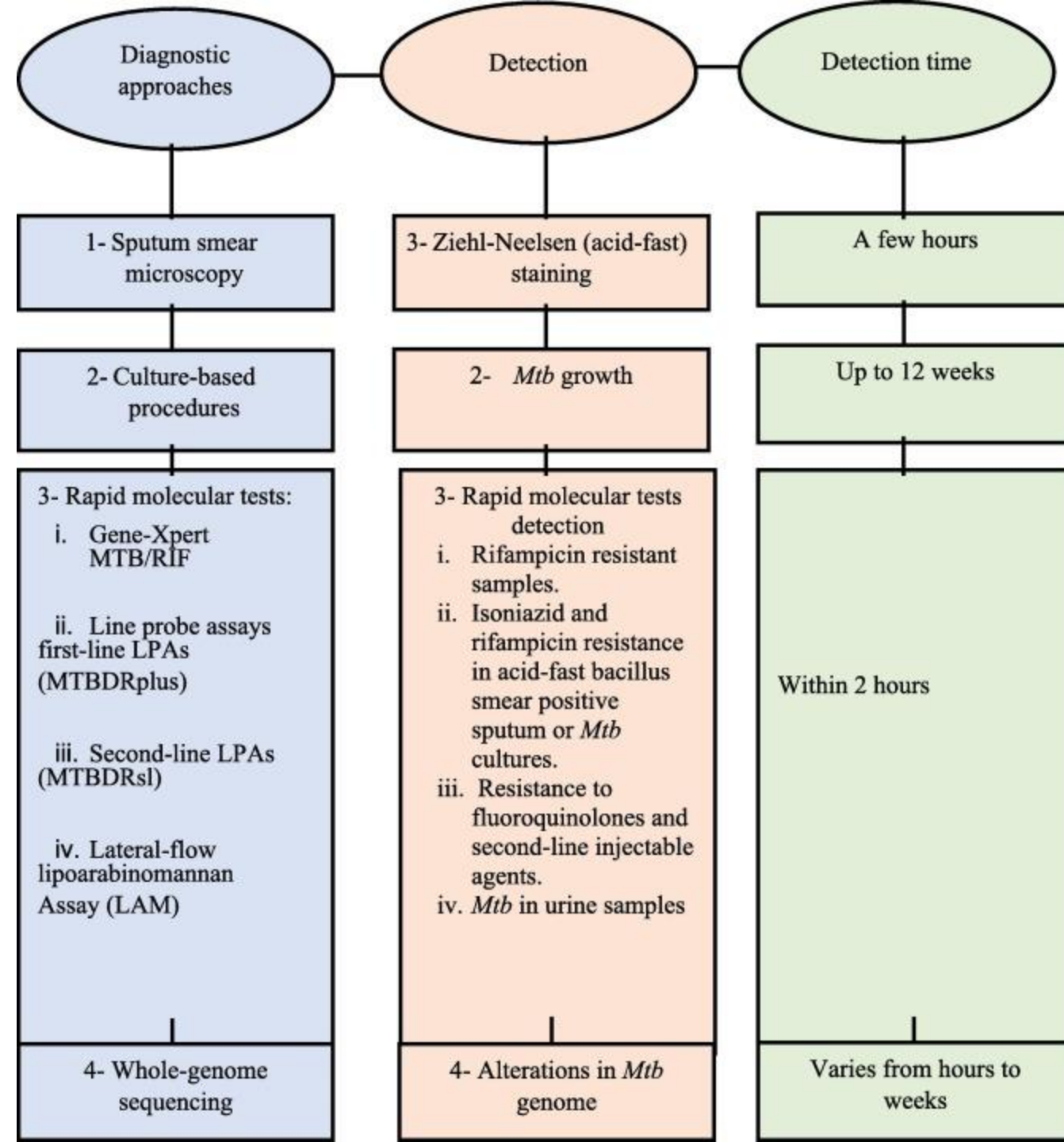
Percorso diagnostico: Valutazione clinica

| Sede/Organo Coinvolto | Sintomi Principali | | |
|----------------------------|---|--|---|
| Polmoni | Tosse persistente, emottisi, dolore toracico, dispnea, febbre, sudorazioni notturne | Apparato genito-urinario | Disuria, ematuria, dolore lombare, infertilità, irregolarità mestruali |
| Pleura | Dolore toracico pleuritico, versamento pleurico, dispnea | Apparato gastrointestinale | Dolore addominale, diarrea, massa palpabile, ascite, emorragie |
| Linfonodi (linfadenite TB) | Tumefazioni molli e indolenti, spesso cervicali, con possibile fistola cutanea | Cute (lupus vulgaris, tubercolosi cutanea) | Noduli, ulcere croniche, placche eritematose o verrucose |
| Sistema nervoso centrale | Cefalea, alterazioni dello stato mentale, rigidità nucale, segni neurologici focali | Fegato e milza | Epatosplenomegalia, febbre, astenia |
| Ossa e articolazioni | Dolore localizzato, gonfiore, limitazione funzionale, deformità (es. morbo di Pott) | Tubercolosi miliare | Sintomi sistemici gravi: febbre alta, sudorazioni, perdita di peso, insufficienza multiorgano |

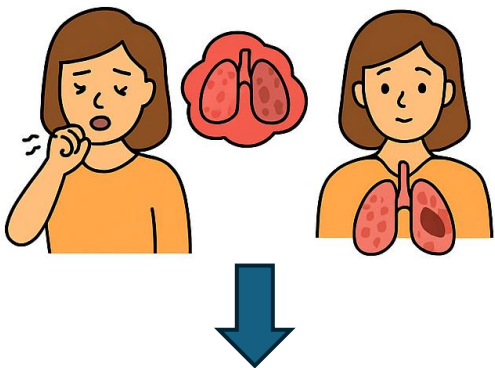
Percorso diagnostico: diagnostica per immagini

| Tipo di Tubercolosi | Aspetti Radiologici Tipici |
|------------------------------|--|
| TB primaria | <ul style="list-style-type: none">– Linfadenopatia ilare o mediastinica (soprattutto nei bambini)– Atelettasie segmentarie– Infiltrati lobari o segmentari |
| TB post-primaria | <ul style="list-style-type: none">– Infiltrati nei lobi superiori o segmento apicale dei lobi inferiori– Cavitazioni a pareti spesse– Fibrosi e retrazione ilare |
| TB miliare | <ul style="list-style-type: none">– Pattern micronodulare diffuso (< 2 mm), distribuzione uniforme in entrambi i polmoni– Aspetto “neve che cade” |
| TB extrapolmonare (pleurica) | <ul style="list-style-type: none">– Versamento pleurico unilaterale– Possibile ispessimento pleurico cronico |

Percorso diagnostico: analisi microbiologica

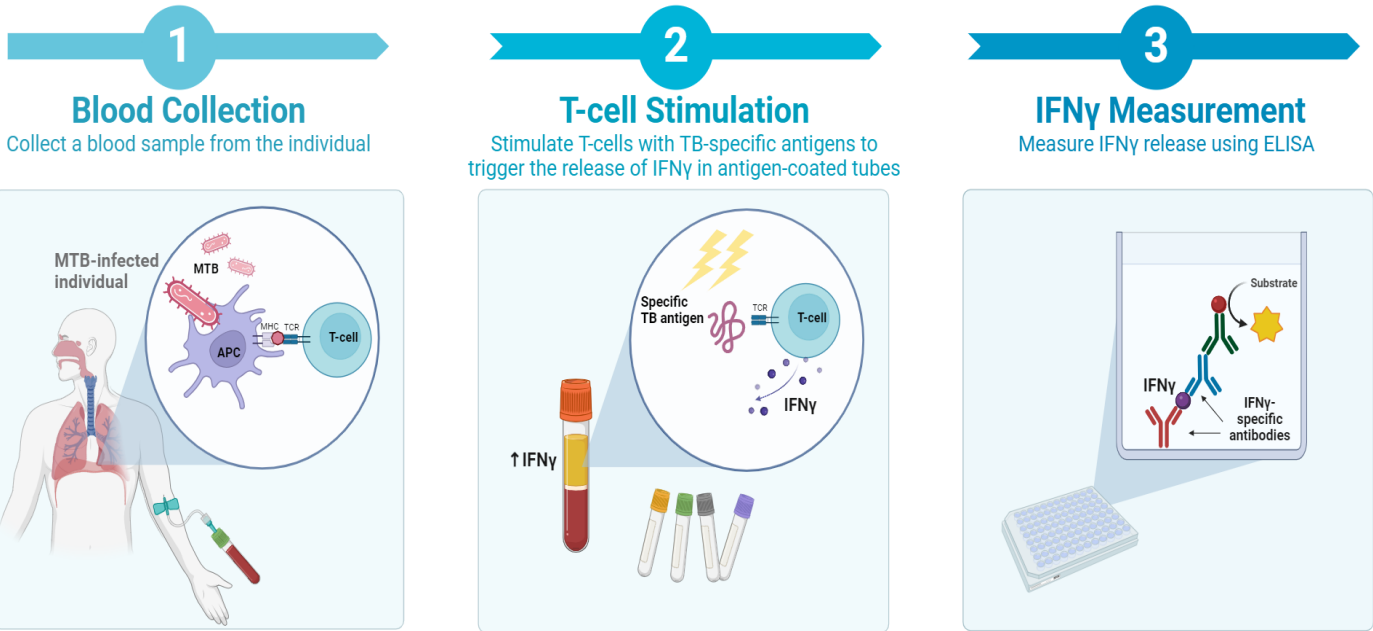


Percorso diagnostico: test microbiologici immunologici (1/2)



Test del sangue per la tubercolosi (o IGRA)

Steps of Interferon gamma release assay (IGRA)

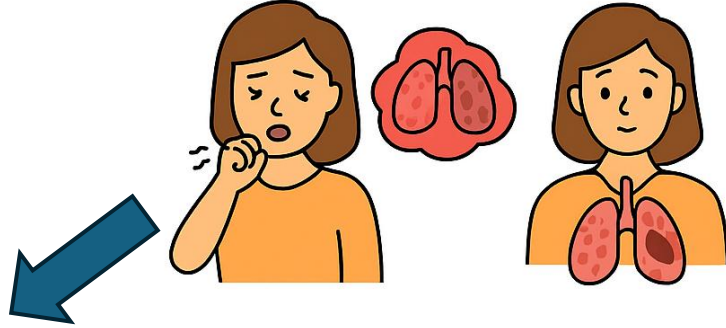


IGRA (es. Quantiferon-TB Gold, T-SPOT.TB)

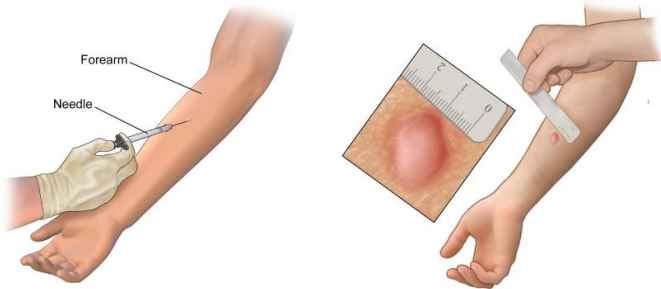
- **Modalità:** prelievo ematico per valutare la produzione di interferone- γ in risposta agli antigeni di *M. tuberculosis*.
- **Vantaggi:** Più specifico nei vaccinati con BCG, Richiede una sola visita, Nessuna reazione soggettiva da interpretare

| Risultato IGRA | Significato clinico |
|----------------|--|
| Positivo | Probabile infezione da <i>M. tuberculosis</i> (latente o attiva) |
| Negativo | Improbabile infezione (ma non esclude nelle forme avanzate o immunodepressi) |
| Indeterminato | Risultato non valido – ripetizione consigliata |

Percorso diagnostico: test microbiologici immunologici (2/2)



Test cutaneo per la tubercolosi (o TST o Mantoux Test)



✓ Mantoux test

- Iniezione intradermica, sulla faccia palmare dell'avambraccio, di 5 UT (unità tubercoliniche) o PPD (derivato proteico purificato)
- Lettura dopo 48-72 ore

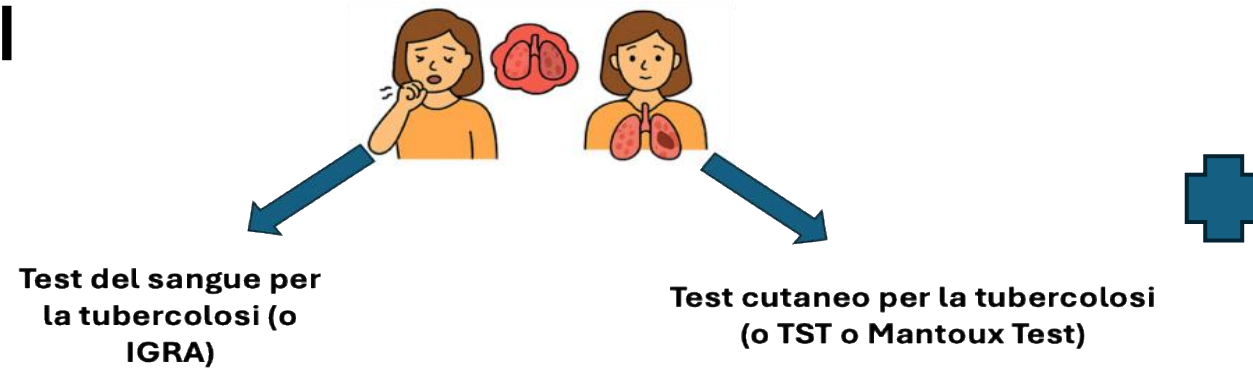
Vantaggi

- Semplice da eseguire (ad esempio, non sono necessarie attrezzature di laboratorio)
- Basso costo
- Non c'è bisogno di salasso
- Definizioni consolidate delle conversioni dei test cutanei per la tubercolosi
- Eredità di decenni di ricerca clinica ed epidemiologica


Svantaggi

- Richiede personale qualificato per amministrare e interpretare
- Richiede una corretta refrigerazione e un piano di inventario per la soluzione del test cutaneo
- Richiede due o più visite del paziente
- Una precedente [vaccinazione BCG](#) o un'infezione da micobatteri non tubercolari possono causare risultati falsi positivi
- Le infezioni concomitanti possono causare risultati falsi negativi
- Effetti avversi rari
- Può causare il fenomeno del booster
- Soggetto a pregiudizi ed errori nel posizionamento e nella lettura del test cutaneo della tubercolosi

Percorso diagnostico: test microbiologici immunologici



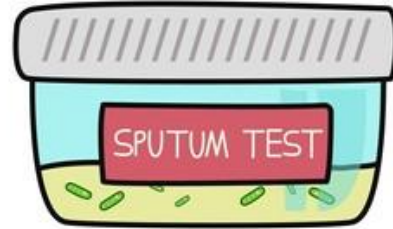
Diagnostica per immagini (RX torace)

- Gli operatori sanitari sono incoraggiati a utilizzare i test del sangue per la tubercolosi per rilevare l'infezione. I test del sangue per la tubercolosi sono preferibili per:
 - Le persone che hanno ricevuto il [vaccino BCG](#) e
 - Persone che potrebbero avere meno probabilità di tornare per la lettura e l'interpretazione del test cutaneo per la tubercolosi.
- I test cutanei per la tubercolosi rappresentano un'alternativa accettabile nei casi in cui un esame del sangue per la tubercolosi non è disponibile, è troppo costoso o troppo gravoso.
- Linee guida attuali [del CDC](#)  raccomandano il [test cutaneo per la tubercolosi](#) come metodo di analisi per i bambini di età inferiore ai 5 anni.

Analisi microbiologica (1/2)



Microscopia (colorazione
Ziehl-Neelsen)



- **Campioni respiratori (alte o basse vie);**

- **Aspirato gastrico;**

- **Urina;**

- **Biopsie**

Ricerca del *Mycobacterium tuberculosis* tramite colorazione di Ziehl-Neelsen:

- **Campione:** espettorato, aspirato gastrico, liquido pleurico, biopsie

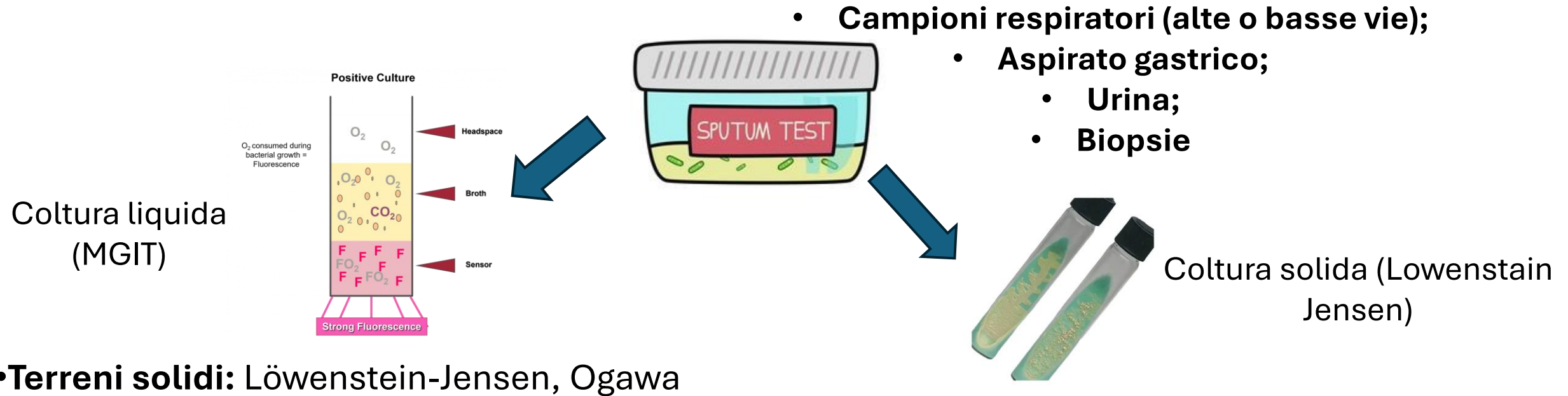
- **Tecnica:** colorazione per acido-alcol resistenti (BAAR)

- **Vantaggi:** rapido, economico

- **Limiti:** sensibilità bassa (~50–60%), richiede carica batterica elevata ($>10^4$ bacilli/ml)

- **Indicazioni:** utile per screening iniziale e nei contesti a risorse limitate

Analisi microbiologica (2/2)



• **Terreni solidi:** Löwenstein-Jensen, Ogawa

• **Terreni liquidi:** sistemi automatizzati (es. BACTEC MGIT 960)

• **Tempi di crescita:** 3–8 settimane su terreni solidi, 1–3 settimane su terreni liquidi

• **Sensibilità:** elevata, anche con cariche batteriche basse

• **Vantaggi:** consente identificazione e test di sensibilità ai farmaci

• **Limiti:** tempi lunghi, necessità di laboratori specializzati

Analisi molecolare (PCR) (1/2)

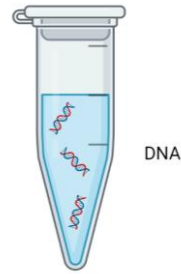


Test di amplificazione
degli acidi nucleici
(NAAT)
(test Xpert MTB/RIF o
Ultra)

| Test | Manufacturer | Description | Type ^a of approval | Resistance detected |
|---|--|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Initial diagnostic tests for diagnosis of TB without detection of drug resistance | | | | |
| Loopamp™ MTBC detection kit | Eiken Chemical, Tokyo, Japan | Manual or automated NAAT | Individual | None |
| FluoroType® MTB | Bruker/Hain Lifescience, Nehren, Germany | Automated NAAT | MC-aNAAT | None |
| Initial diagnostic tests for diagnosis of TB with detection of drug resistance | | | | |
| Xpert® MTB/RIF | Cepheid, Sunnyvale, CA, USA | Automated NAAT | Individual | RIF |
| Xpert MTB/RIF Ultra | Cepheid, Sunnyvale, CA, USA | Automated NAAT | Individual | RIF |
| Truenat® MTB or MTB Plus for TB detection, reflexing ^b to Truenat MTB-RIF-Dx for DR-TB detection | Molbio Diagnostics, Goa, India | Automated NAAT | Individual | RIF |
| RealTime MTB for TB detection, reflexing ^b to RealTime MTB RIF/INH for DR-TB detection | Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA | Automated NAAT | MC-aNAAT | RIF, INH ^c |
| BD MAX™ MDR-TB | Becton Dickinson, Sparks, MD, USA | Automated NAAT | MC-aNAAT | RIF, INH ^c |
| FluoroType MTBDR | Bruker/Hain Lifescience, Nehren, Germany | Automated NAAT | MC-aNAAT | RIF, INH ^c |
| cobas® MTB for TB detection, reflexing ^b to cobas MTB RIF/INH for DR-TB detection | Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, USA | Automated NAAT | MC-aNAAT | RIF, INH ^c |
| Follow-on diagnostic tests for detection of drug resistance | | | | |
| Xpert MTB/XDR | Cepheid, Sunnyvale, USA | Automated NAAT | LC-aNAAT | INH, FQ, ETO, AMK |
| GenoType MTBDR _{plus} | Bruker/Hain Lifescience, Nehren, Germany | Manual reverse hybridization assay | FL-LPA | RIF, INH, ETO |
| Genoscholar™ NTM + MDRTB Detection Kit | NIPRO Corporation, Osaka, Japan | Manual reverse hybridization assay | FL-LPA | RIF, INH ^p |
| GenoType MTBDRs/ | Bruker/Hain Lifescience, Nehren, Germany | Manual reverse hybridization assay | Individual | FQ, AMK |
| Genoscholar PZA-TB | NIPRO Corporation, Osaka, Japan | Manual reverse hybridization assay | HC-rNAAT | PZA |

Analisi molecolare (NGS) (2/2)

Sequenziamento del genoma (NGS)



DNA



Workflow General workflow for high throughput sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*

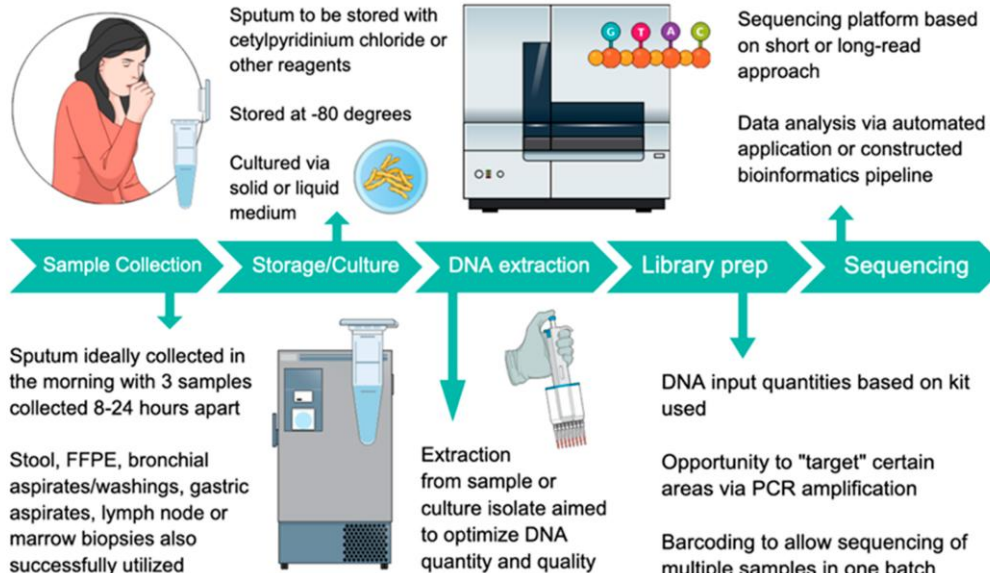


Table 1: Examples of commercially available library preparation kits for different NGS instruments

| Library preparation kit | System compatibility | NGS application | Input quantity [ng] |
|-----------------------------|------------------------|-----------------|---------------------|
| Nextera XT | All Illumina | WGS or Targeted | 1 |
| Nextera DNA Flex | All Illumina | WGS or Targeted | 1-500 |
| AmpliSeq | All Illumina | Targeted | 1-100 |
| Ion Xpress Plus Fragment | PGM and S5 Ion Torrent | WGS or Targeted | 100 |
| MuSeek | PGM and Proton | WGS or Targeted | 100 |
| Rapid Sequencing Kit | All ONT devices | WGS or Targeted | 400 |
| Ligation Sequencing Kit 1D | All ONT devices | WGS or Targeted | 1000 |
| Low Input by PCR Sequencing | All ONT devices | WGS or Targeted | < 100 |
| 1D ² Sequencing | All ONT devices | WGS or Targeted | 1000 |

Table 3: Comparison of commercially available NGS instruments

| Sequencing platform | Sequencing kit | Number of samples per run | Sequencing cost* per sample (USD) | Typical run output | Sequencing run time | Type of analysis possible |
|---------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------|--|
| Illumina MiSeq | MiSeq v2 (2x250bp) | 54 | \$22.41 | 7.5-8.5 GB | 39 hrs | SNP and INDEL analysis |
| Ion Torrent | Ion 318 Chip v2 (400 base) | 13 | \$48.75 | 1.2-2 GB | 7.3 hrs | SNP and INDEL analysis |
| Oxford Nanopore | Ligation Sequencing kit 1D | 22 | \$42.86 | 2-3 GB | 6 hrs | Genomic rearrangement, SNP, and INDEL analysis |
| | | 54 | \$16.67 | 4-8 GB | 48 hrs | |

Confronto tra metodi diagnostici

| Method | Use | Detection | Duration and Sensitivity |
|--|---|--|--|
| Culture | <u>The gold standard</u> (Agar-based and egg-based media incorporating green malachite and Middlebrook broths or solid media) | Sputum samples can be cultured in one of two ways: 1. Solid media (observed by visualizing the colonies), dug susceptibility testing and mycobacterial growth 2. Liquid media (detected by microscopic observation), drug susceptibility testing and tuberculosis detection | Results within 3 or 4 weeks with 79–82% sensitivity |
| Löwenstein–Jensen media (LJ) | Malachite green dye added to glycerated egg-potato medium | Prevent MTB from growing while also providing a contrast color that makes Mycobacterium colonies easier to observe. <u>Susceptibility test for antibiotic.</u> | Results within 2 to 3 weeks or several months. (92.7%) sensitivity |
| Microscopic Diagnosis (smear microscopy) | Ziehl Neelsen technique; bacteriological stain used to identify acid-fast organisms, mainly Mycobacteria. | The detection of acid-fast bacilli (AFB) in stained and acid-washed smears examined microscopically may provide the primary bacteriologic diagnosis of mycobacteria among a clinical specimen. This is <u>a quick and effortless technique.</u> | Results within 1–2 days, with (78–92.9%) sensitivity |
| Skin test | Mantoux test, performed by injection of 0.1 mL of fluid containing 5 TU (tuberculin units) PPD (purified protein derivative) into the forearm's top layers of skin. | Transverse induration at the TB skin tests (TST) spot is measured in millimeters after 48–72 hours, and the optimum cut point ranges from 2 mm to 16 mm, <u>depending on prevalence and testing purpose.</u> | Results within 48–72 hours. Sensitivity in younger patients is 70%, in elderly patients is 27% |
| Interferon-gamma release assays (IGRA) | QuantiFERON – TB Gold and T-Spot TB assay. A blood test determines whether or not a person has been exposed to the (TB) bacterium. | The cytokine INF, which is produced by the T cells during the infection by MTB, is measured via a serological test. <u>Unable to differentiate between latent and active infections.</u> | Results within 24 hours with 93% sensitivity |
| Chest radiography | CXR chest X-ray identification of lung abnormalities. | Cavitation caused by TB bacteria in lung tissue and acute TB pulmonary could be detected easily by using CXR imaging, however, <u>in the extra-pulmonary TB area not able to be recognized using chest radiography.</u> | Results within a few minutes, sensitivity is 93% |
| Molecular assays | Detect mycobacterial gene mutations associated with anti-TB drug resistance: 1. Line probe assay (LPA) 2. Nucleic acid amplification technology (NAAT) | 1. LPA: Rapid technique based on polymerase chain reaction (PCR) that is used to detect MTB complex as well as <u>drug sensitivity to rifampicin (RPM) and isoniazid (INH)</u> 2. NAAT: Rapid molecular method for detecting tiny quantities of an organism's genetic material in a particular specimen (genetic material nucleic acids). NAAT method entails amplification inhibition screening. | 1. Results within 1–2 days sensitivity 81.3–100% 2. Results within 24 hours and sensitivity 98.2% |
| Volatile organic compounds test (VOCs) | VOCs in the head space of cultured MTBs were collected on sorbent traps and analyzed using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). | VOCs in exhale breath serve as tuberculosis (TB) biomarkers since MTB produces VOC metabolites as being detected in the exhale of infected people. | Results within few minutes, an hour, 8 hours, or 24 hours, sensitivity 89.4% |

Malattia tubercolare resistente ai farmaci

Resistenza primaria ai farmaci ^

La resistenza primaria ai farmaci è causata dalla trasmissione da persona a persona del batterio della tubercolosi resistente ai farmaci.

Resistenza secondaria ai farmaci ^

La resistenza secondaria ai farmaci (detta anche resistenza acquisita) si sviluppa durante il trattamento della tubercolosi. La resistenza secondaria può svilupparsi quando:

- Un paziente non viene trattato con il regime terapeutico appropriato,
- Un paziente non segue il regime di trattamento prescritto (assumendo i farmaci in modo errato o irregolare),
- Il corpo del paziente non assorbe i farmaci, o
- Le interazioni farmacologiche causano bassi livelli sierici

• **La tubercolosi monoresistente** è causata da batteri della tubercolosi resistenti a un solo farmaco

• **La tubercolosi poliresistente** è causata da batteri della tubercolosi resistenti ad almeno due farmaci antitubercolari. **La tubercolosi multifarmaco-resistente (MDR TB)** è causata da batteri della tubercolosi resistenti almeno all'isoniazide e alla rifampicina

• **La tubercolosi pre-estensivamente resistente ai farmaci (pre-XDR TB)** è un tipo di tubercolosi multiresistente causata da batteri della tubercolosi resistenti a:

- Isoniazide, rifampicina e un fluorochinolone o
- Isoniazide, rifampicina e un iniettabile di seconda linea (amikacina, capreomicina e kanamicina).

• **La tubercolosi ampiamente resistente ai farmaci (TBX)** è un raro tipo di tubercolosi multiresistente causata da batteri della tubercolosi resistenti a:

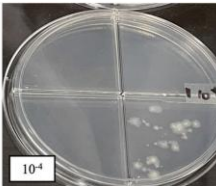
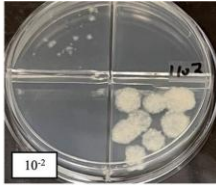
- Isoniazide e rifampicina, un fluorochinolone e un iniettabile di seconda linea (amikacina, capreomicina e kanamicina) o
- Isoniazide, rifampicina, un fluorochinolone e bedaquilina o linezolid.

Test di resistenza ai farmaci

- **Rilevamento molecolare della resistenza ai farmaci (MDDR)**
(campioni respiratori da testare subito in caso di rischio MDR-TB, positività AFB/NAA, contatti con MDR, controindicazioni ai farmaci, difficoltà nei test convenzionali; limiti: alcune mutazioni non sono clinicamente rilevanti, assenza genetica \neq assenza resistenza)

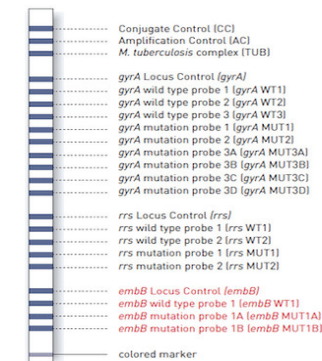


- **Test di sensibilità ai farmaci basati sulla crescita**
(test di sensibilità su terreno liquido o solido: crescita in presenza del farmaco = resistenza; liquido più rapido: 7–14 giorni vs solido fino a 21 giorni; usati per valutare la suscettibilità ai farmaci antitubercolari di prima linea)

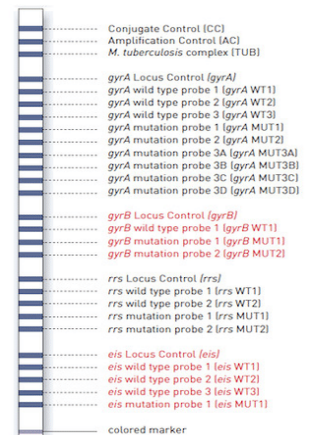


- **Test di suscettibilità ai farmaci di seconda linea**
(test di sensibilità ai farmaci di seconda linea solo in laboratori di riferimento; indicati in caso di trattamento TB precedente, intolleranza ai farmaci di prima linea, contatto con MDR-TB, resistenza dimostrata ai farmaci di prima linea, colture positive oltre 3 mesi di terapia)

GenoType MTBDRsl VER 1.0



GenoType MTBDRsl VER 2.0



Differences between the two versions are marked in red