

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOLOGIA – *Biomedico e Biomolecolare*

---

TESI DI LAUREA

*“Next Generation Sequencing e Micobatteri:*

*un approccio avanzato e innovativo nel campo della diagnosi micobatteriológica”*

*Relatore: Prof.ssa Masini Maria Angela*

*Correlatore: Dott.ssa Gotta Franca*

*Secondo Correlatore: Dott.ssa Vay Daria*

*Candidata: Incarbone Liliana*

*N° Matricola: 20026813*

*Anno Accademico 2022/2023*

## INDICE

<b>1 INTRODUZIONE</b>	
<b>1.1 TUBERCOLOSI (TB)</b> .....	4
<b>1.2 EZIOLOGIA</b> .....	5
<b>1.3 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	8
1.3.1 Situazione epidemiologica Globale.....	8
1.3.2 Situazione epidemiologica Europea.....	13
1.3.3 Situazione epidemiologica Italiana.....	16
1.3.4 Situazione epidemiologica in Piemonte.....	19
<b>1.4 FISIOPATOLOGIA DELLA TUBERCOLOSI</b> .....	21
1.4.1 Modalità e rischio di infezione.....	21
<b>1.5 ASPETTI CLINICI</b> .....	21
1.5.1 Eventi clinici della tubercolosi.....	22
<b>1.6 DIAGNOSI</b> .....	24
1.6.1 Criteri Microbiologici .....	24
1.6.2 Criteri Radiologici .....	25
1.6.3 Criteri Immunologici.....	26
<b>1.7 TERAPIA</b> .....	30
<b>1.8 PREVENZIONE</b> .....	33
<b>2 STUDIO</b> .....	34
2.1 Scopo dello studio.....	34
<b>2.2 MATERIALI E METODI: PROCEDURE DI LABORATORIO</b> .....	35
2.2.1 Fase pre-analitica: raccolta dei campioni.....	35
2.2.2 Preparazione del campione: decontaminazione.....	37
<b>2.3 ESAME MICROSCOPICO</b> .....	38
<b>2.4 ESAME COLTURALE</b> .....	40
<b>2.5 RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE</b> .....	44
2.5.1 PCR mediante il sistema GeneXpert MTB/RIF Ultra.....	44
2.5.2 Identificazione mediante LPA.....	46
2.5.3 Test fenotipico di rilevazione delle resistenze farmacologiche di <i>M. tuberculosis</i> .....	49
<b>2.6 NGS: tecnica di sequenziamento genico applicata ai micobatteri</b> .....	50

<b>3</b>	<b>RISULTATI .....</b>	<b>54</b>
	3.1 Tubercolari (MTB).....	54
	3.2 Non Tubercolari (NTM).....	66
<b>4</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>68</b>
	4.1 Tubercolari (MTB).....	68
	4.2 Non Tubercolari (NTM).....	72
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>73</b>
	➤ Prospettive Future.....	74
	<b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....</b>	<b>75</b>

***RINGRAZIAMENTI***

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 TUBERCOLOSI (TB)

La tubercolosi (TB) è una malattia infettiva contagiosa per la quale si richiede notifica obbligatoria.

In soggetti a rischio di esposizione, l'infezione può manifestarsi in diverse fasi: dalla permanenza come infezione tubercolare latente, senza segni o sintomi evidenti di malattia, fino all'evoluzione progressiva verso una tubercolosi iniziale (dove i sintomi e i segni della malattia sono ancora assenti), una tubercolosi subclinica (caratterizzata da assenza di sintomi ma è evidenziabile solo attraverso esami di laboratorio), e infine la forma attiva di malattia tubercolare.

(Gabriel T Mashabela et al., 2019).

La TB è trattabile con protocolli terapeutici standard di farmaci antitubercolari.

Tuttavia, se il trattamento non è adeguato, possono svilupparsi resistenze che rendono la guarigione più difficile.

Le forme farmacoresistenti di TB sono classificate in:

- MDR-TB: resistente a rifampicina ed isoniazide.
- Pre-XDR-TB, resistente a rifampicina e anche ai fluorochinoloni,
- XDR-TB, resistente ai fluorochinoloni e anche a bedaquilina e/o linezolid, rappresentano varianti gravi che richiedono cure specifiche e devono essere diagnosticate e trattate solo in centri specializzati.

In Italia, la TB è considerata una malattia di bassa endemia, con una prevalenza inferiore a 7 casi su 100.000 abitanti.

Come in molti altri Paesi a bassa endemia, i casi si concentrano principalmente nelle grandi città principali e interessano principalmente persone nate in Paesi con una maggiore prevalenza della malattia.

Nonostante l'Italia presenti un livello di endemia ridotto, la gestione della diagnosi, del trattamento e della prevenzione della tubercolosi rimane una priorità.

Questa attenzione è particolarmente significativa considerando l'impatto delle migrazioni e dei movimenti internazionali, fattori che possono influenzare la distribuzione della malattia nel paese. (WHO., rev 2023)

## 1.2 EZIOLOGIA

I micobatteri vengono generalmente suddivisi in:

- **Micobatteri tubercolari**, ossia capaci di scatenare la tubercolosi nell'ospite.

*Mycobacterium tuberculosis* è stato scoperto per la prima volta da Robert Koch nel 1882 (Anne-Laure Banuls et al., 2015)

Questo gruppo è costituito dai tre batteri del cosiddetto *Mycobacterium tuberculosis complex*: *Mycobacterium tuberculosis* (responsabile della tubercolosi umana), *Mycobacterium africanum* (correlato alla stessa patologia del *M. tuberculosis*, seppure leggermente differente sotto il profilo biochimico ed isolato con maggiore frequenza in Africa) e *Mycobacterium bovis* (responsabile della tubercolosi bovina, zoonosi trasmissibile all'uomo per via alimentare). (Issar Smith., 2003)

- Un altro gruppo, il più nutrito in assoluto, è costituito dai **micobatteri non tubercolari atipici** (NTM) ossia da micobatteri che causano una serie di patologie diverse dalla tubercolosi nell'ospite umano, ma solo in concomitanza di particolari condizioni che abbassino le difese immunitarie dell'organismo colonizzato.

Gli NTM essendo dei microorganismi ambientali si ritrovano facilmente nelle acque naturali (Enrico Tortoli., 2014) ed inoltre li possiamo ritrovare nel suolo, nei terricci, nelle torbe, nei terreni ricchi di fertilizzanti, negli ambienti paludosi o nelle foreste boreali (OMAR Osservazione malattie rare).

Complessi	Specie
<i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. bovis BCG</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. pinnipedii</i> , <i>M. canettii</i>
<i>Mycobacterium avium complex</i>	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. chimaera</i> , <i>M. colombiense</i>
<i>Mycobacterium terrae complex</i>	<i>M. terrae</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. arupense</i> , <i>M. hiberniae</i> , <i>M. kumamotoense</i>

Tabella 1: complessi e specie di *Mycobacterium*

L'uomo rappresenta l'unico serbatoio per *Mycobacterium tuberculosis*, è un microrganismo aerobico, ciò si evidenzia poiché gli organi maggiormente colpiti sono quelli con una elevata pressione parziale di ossigeno, come i reni e gli apici polmonari.

Questo microrganismo mostra un ottimo adattamento a una temperatura di 37°C. La sensibilità al calore, soprattutto umido, è evidente (ad esempio, viene rapidamente eliminato in autoclave a 120°C).

Al contrario, la resistenza al freddo è notevole, mantenendosi vitale per diversi giorni a +4°C e per alcuni mesi a -75°C, specialmente quando è protetto dalla luce solare.

Il *Mycobacterium tuberculosis* non viene classificato né come Gram-negativo né come Gram-positivo in quanto ha caratteristiche comuni ad entrambi. Appartenenti alla famiglia delle *Mycobacteriaceae*, sono bacilli immobili, non sporigeni, aerobi obbligati.

Al microscopio si presenta come un bastoncino immobile di dimensioni ridotte di 0,2-0,6 x 1-10 µm, caratterizzati dalla lenta crescita, da una parete ricca di acidi micolici e da un DNA con elevato contenuto di guanina e citosina (60-70%).

(Enrico Tortoli, Microbiologia clinica ed 2008)

La parete cellulare di *Mycobacterium tuberculosis* riveste un ruolo estremamente significativo nella crescita e nella sopravvivenza del batterio.

Caratterizzata da una complessità notevole, presenta uno spessore elevato, superiore ai 20 nm, e si distingue dalla membrana plasmatica attraverso uno spazio periplasmatico di circa 10 nm.

All'interno della parete cellulare, sono individuabili lipidi e anche proteine, alcune delle quali costituiscono l'antigene che provoca l'ipersensibilità di tipo ritardato negli individui infettati.

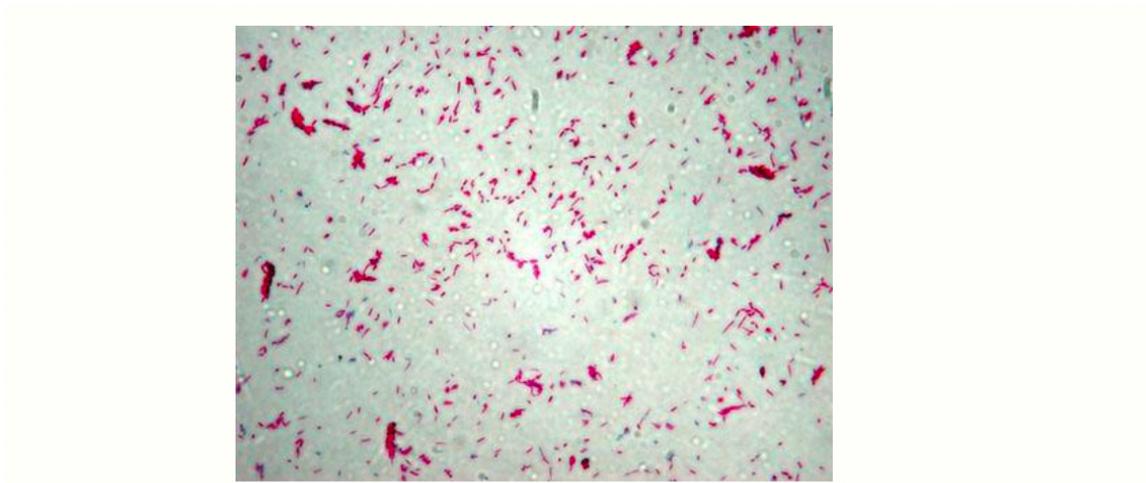
La caratteristica distintiva dell'alcol-acido-resistenza, evidenziata dalla colorazione di Ziehl-Neelsen, è cruciale nella diagnostica dei micobatteri.

Questa tecnica prevede il trattamento del preparato con una soluzione di fucsina, poi si prosegue con il riscaldamento del vetrino.

Successivamente, si procede al lavaggio con acqua e decolorazione con una soluzione di HCl al 3% in alcol etilico per 30-60 secondi, seguita da una colorazione di contrasto utilizzando blu di metilene.

I micobatteri hanno la caratteristica di essere gli unici a mantenere il colore rosso della fucsina dopo essere stato trattato, mentre tutti gli altri materiali vengono decolorati e ricolorati in blu durante la colorazione di contrasto.

Pertanto, i micobatteri sono facilmente riconoscibili e identificabili come bacilli rossi all'interno di un campo blu (Figura 1), sottolineando l'efficacia di questa tecnica di tintura nella diagnosi di *M. tuberculosis*.



*Figura 1: Colonie di Mycobacterium Tuberculosis visualizzate al microscopio ottico dopo colorazione con Ziehl-Nelsen*

## 1.3 EPIDEMIOLOGIA

### 1.3.1 Situazione epidemiologica Globale

Tutte le informazioni più aggiornate relative allo stato epidemiologico mondiale dell'infezione tubercolare sono contenute nel **WHO Report 2023 – Global Tuberculosis Report**, che ha raccolto i dati provenienti da stati e regioni dal 2005-2021.

L'impatto della pandemia COVID-19 sulla tubercolosi (TB) si è manifestato attraverso un calo globale delle nuove diagnosi.

Dopo un significativo aumento tra il 2017 e il 2019, si è verificata una riduzione del 18% tra il 2019 e il 2020, passando da 7,1 milioni a 5,8 milioni di nuovi casi.

Nel 2021, si è osservata una parziale ripresa, con un totale di 6,4 milioni di nuovi casi.

Il 2022 ha visto un ulteriore aumento, portando il numero globale di nuove diagnosi notificate ufficialmente a 7,5 milioni di casi di TB. Questi dati indicano una dinamica complessa e in continua evoluzione, in cui l'impatto della pandemia ha influito significativamente sulla gestione e sulla segnalazione dei casi di tubercolosi.



*Figura 2* diagnosi di TB a livello Globale (WHO 2023)

Dal punto di vista geografico, nel 2022, i trenta Paesi fortemente colpiti da TB rappresentano l'87% del totale dei casi di tubercolosi che sono stati stimati nel mondo, e otto di questi Paesi rappresentano più di due terzi del totale globale:

India (27%), Indonesia (10%), Cina (7,1%), Filippine (7,0%), Pakistan (5,7%), Nigeria (4,5%), Bangladesh (3,6%) e Repubblica Democratica del Congo (3,0%).

La tubercolosi può colpire chiunque indipendentemente dall'età o dal sesso.

I dati del 2022 evidenziano negli uomini adulti (età  $\geq 15$  anni), una percentuale maggiore rappresentando il 55% del totale stimato di casi di tubercolosi pari a 5,8 milioni di casi, mentre, le donne adulte (età  $\geq 15$  anni) rappresentano 3,5 milioni di casi, pari al 33% del totale stimato.

Invece, tra i più giovani, i bambini (età 0-14 anni) si trovano a dover affrontare la tubercolosi con una stima di 1,3 milioni di casi, costituendo il 12% del totale.

Nonostante la prevalenza minore rispetto agli adulti, il fatto che i bambini siano comunque colpiti sottolinea la necessità di strategie di prevenzione e gestione specifiche per questa fascia di età. (WHO., rev 2023)

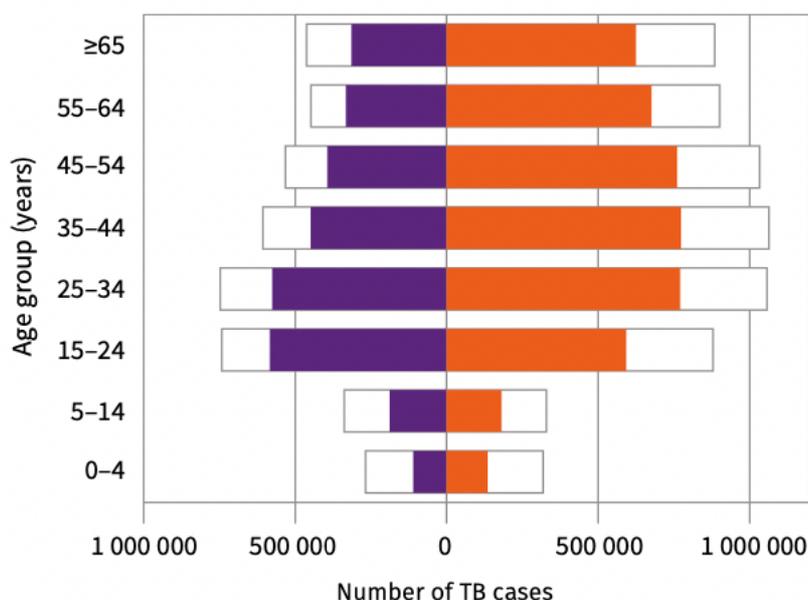


Figura 3: Tassi di incidenza di TB nel 2022 per età e sesso (donne in viola, uomini in arancione)

La tubercolosi resistente ai farmaci continua a rappresentare un problema per la salute pubblica. In particolare, la resistenza alla rifampicina, uno dei farmaci di prima linea più efficaci nel trattamento della tubercolosi, emerge come motivo di grande preoccupazione.

L'OMS definisce:

- (MDR-TB: Multi drug resistant) la tubercolosi provocata da *M. Tuberculosis* resistente ai farmaci di prima linea: rifampicina e isoniazide.
  - PRE-XDR resistenti sia alla rifampicina che a qualsiasi fluorochinolone,
  - (XDR-TB: extensively drug resistant) invece, per quei ceppi MDR resistenti anche ai fluorochinoloni e ad almeno uno dei farmaci usati di seconda linea (amikacina, kanamicina o capreomicina).
- (WHO., 2021)

A livello globale, il numero di persone che hanno sviluppato MDR-TB è rimasto relativamente costante tra il 2020 e il 2022 dopo un lento calo tra il 2015 e 2019.

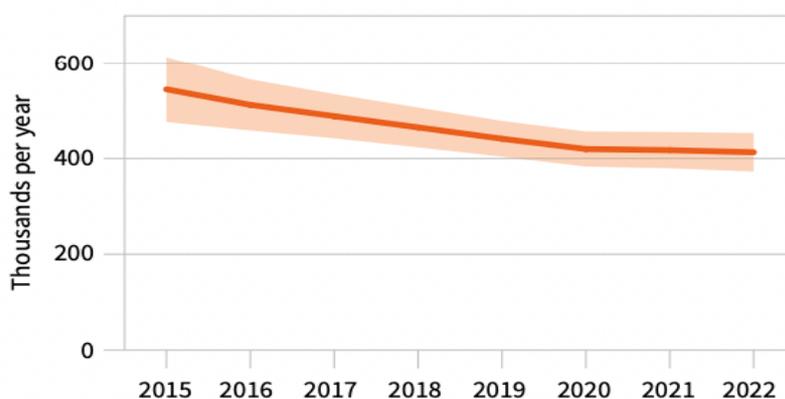


Figura 4 Global trend di incidenza di MDR-RR/TB (WHO 2023)

Nel 2022 la percentuale di persone affette da TB con MDR-TB era pari al 3.3% tra i nuovi casi e il 17% tra i pazienti già trattati, nel 2015 i dati erano rispettivamente del 4% e 25%.

Tre Paesi hanno rappresentato il 42% del numero stimato di persone che hanno sviluppato MDR/RR-TB nel 2022 India (27%), Filippine (7,5%) e Federazione Russa (7,5%) sono quelli che hanno rappresentato la percentuale maggiore di tubercolosi MDR.

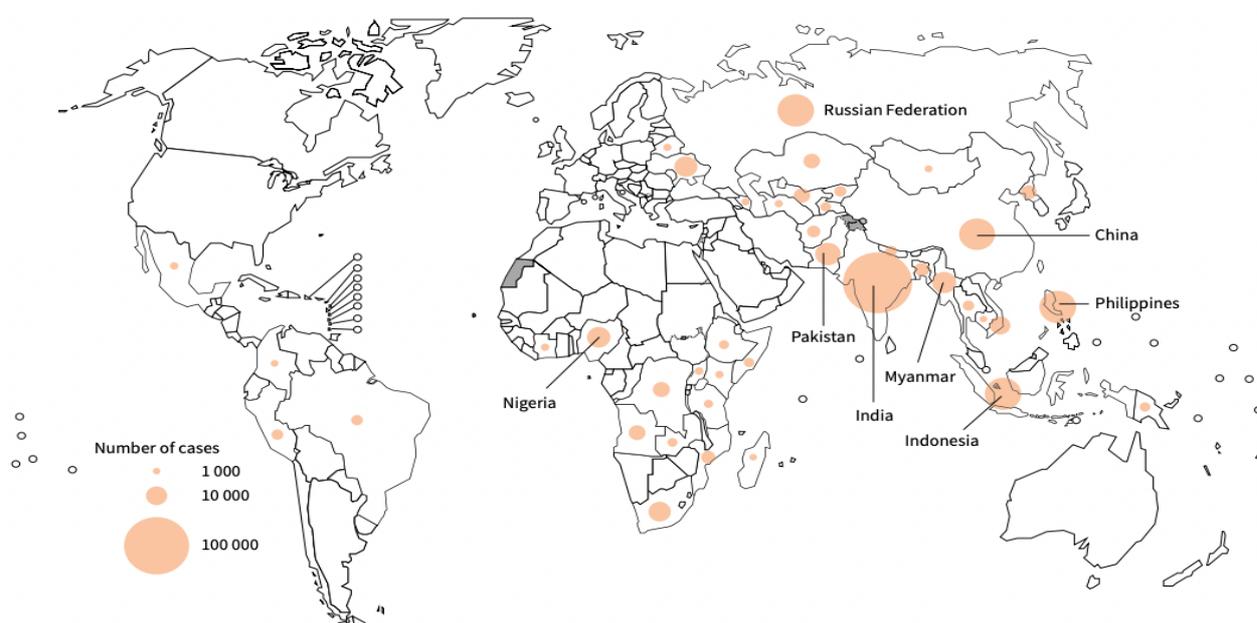


Figura 5: rappresentazione dei tassi di incidenza di MDR-RR/TB nel 2022 (WHO 2023)

Nel 2022, a livello globale, il 73% delle persone (2,9/4,0 milioni) con diagnosi di tubercolosi polmonare confermata batteriologicamente sono state sottoposte a test di resistenza alla rifampicina, rispetto al 69% (2,4/3,5 milioni) del 2021 (2,4/3,5 milioni).

Tra le persone testate, sono state individuate 149 511 persone con MDR/RR-TB e 27 075 persone con XDR-TB per un totale complessivo di 176.586 (4,4% dei testati).

Nonostante l'aumento della copertura dei test e l'incremento del numero di persone sottoposte a test, il numero di persone con MDR/RR-TB è stato inferiore nel 2022 rispetto al 2019 (quando il totale era di 202.009, il 5,6% dei testati).

Questo dato è coerente con la diminuzione stimata della proporzione di persone affette da TB che presentano MDR/RR-TB

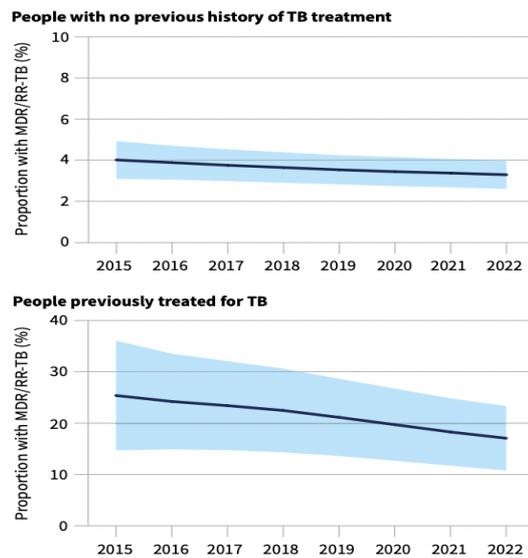


Figura 6: Percentuale di persone con MDR-RR/TB a livello globale 2015-2022 (WHO 2023)

A livello globale nel 2020 (l'ultima coorte di pazienti per cui sono disponibili i dati, il tasso di successo del trattamento è stato del 63%, in aumento rispetto al 60% del 2019 e molto migliore rispetto al livello del 50% del 2012.

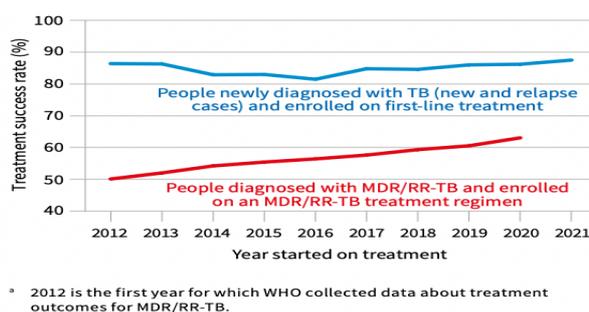


Figura 7: tasso di successo del trattamento 2012-2021 (WHO 2023)

L'obiettivo che è stato stabilito dalla strategia "End TB dell'OMS" (WHO report., 2022) è quello di raggiungere una riduzione dell'incidenza del 50%, e la riduzione del 75% del numero totale di decessi entro il 2025 con una riduzione del 90% entro la fine del 2035 (Who, The end Tb strategy).

Una diretta conseguenza del ritardo o dell'assenza di diagnosi è attribuibile alla sospensione dei servizi dedicati alla tubercolosi durante la pandemia COVID-19 che ha compromesso negativamente entrambi gli obiettivi prefissati.

A livello Globale, la diminuzione netta del numero totale di decessi causati dalla TB tra il 2015 e il 2022 è stata del 19%, (WHO report., 2023)

### **1.3.2 Situazione epidemiologica Europea**

Considerando l'anno 2021, nei Paesi e nelle aree della Regione europea definita dall'OMS, si stima che ci sono stati 230.000 casi di tubercolosi che rappresenta circa il 2,2% del carico totale di TB nel mondo.

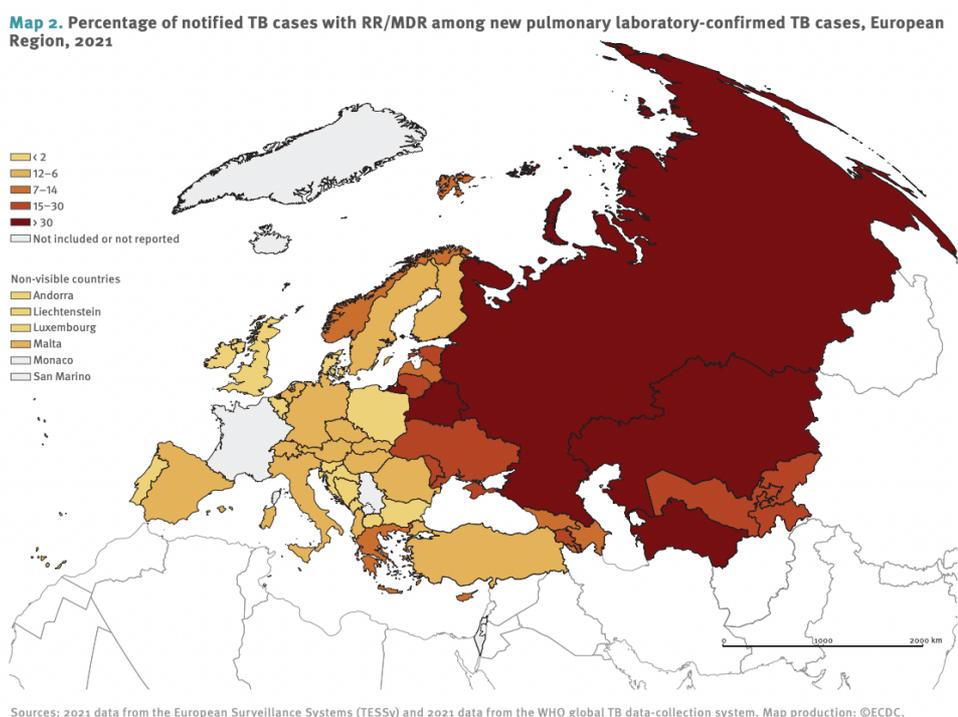
Il numero di casi di TB nella Regione europea dell'OMS è aumentato di 3.000 unità nel 2021.

L'85% dei nuovi casi di TB stimati si sono verificati nei 18 paesi con maggiore prevalenza HPC (High Prevalence Country), il quale tasso è di (48 casi per 100.000 abitanti), che è quasi cinque volte superiore alla media delle restanti regioni.

I cinque paesi con il numero più alto assoluto di casi di TB oltre i 10.000 casi sono stati la Federazione Russa (69.000), Ucraina (31000), Uzbekistan (21000), Turchia (15000) e Kazakistan (14000).

Nel 2021 sono stati dichiarati 166.026 casi di tubercolosi (23% in meno di casi di tubercolosi rispetto al 2019), di cui 137.212 con TB polmonare (l'82,6%), tra quelli confermati in laboratorio (69,9%) il 94,1% sono stati sottoposti a test di suscettibilità ai farmaci:

- 32,6% presentavano RR/MDR-TB,
- 33,4% dei casi aveva una suscettibilità ai fluorochinoloni (DST)
- e la prevalenza di tubercolosi (XDR-TB) estremamente resistente ai farmaci è stata dell'11,2%.



*Figura 8: rappresentazione notifiche di MDR-RR/TB a livello Europeo 2021 (Ecdc 2023)*

Complessivamente, i tassi di segnalazione confermano la tendenza in discesa osservato dal 2012 al 2021, con una riduzione del 45%.

Tuttavia, non è ancora allineato con l'obiettivo di raggiungere il tasso a 2,4 casi per 100.000 abitanti a livello UE/SEE entro il 2030 (ECDC., rev 2023).

## NEI PAESI UE/SEE

Nel 2021, dei 33.520 casi di tubercolosi notificati, il 75,8% (25.402 casi) rappresentava nuove diagnosi in individui mai precedentemente trattati per la TB, il 9,9% (3.332 casi) erano casi precedentemente trattati, mentre per il 14,3% (4.786 casi) il cui stato rispetto alle precedenti terapie non era noto.

Dei 21.397 casi confermati nel 2021, sono 16.544 casi per cui sono reperibili i risultati dei test di sensibilità antitubercolare almeno per quanto riguarda il farmaco di prima linea che è la rifampicina, di cui 695 (4,2%) hanno mostrato una forma di tubercolosi multi-resistente (MDR-TB/RR).

Le percentuali più elevate dei casi di MDR-TB sono state riportate in Estonia (28,4%) e Lituania (17,5%).

Nel 54% dei casi RR/MDR-TB, i test di sensibilità ai farmaci hanno mostrato resistenza ai fluorochinoloni.

Tra questi la pre-XDR-TB è stata identificata in 115 casi (28,5%).

Tra i casi pre-XDR, il 68,7% (79 casi su 115) è stato testato per la suscettibilità ad altri farmaci di prima linea (bedaquiline e linozide), e il 54,4% (43 casi) sono stati identificati come casi di TB estremamente resistente (XDR-TB).

La percentuale è aumentata nel 2021 (dal 45,1%, 37 nel 2020), ma i numeri riportati restano nel complesso bassi (ECDC 2023).

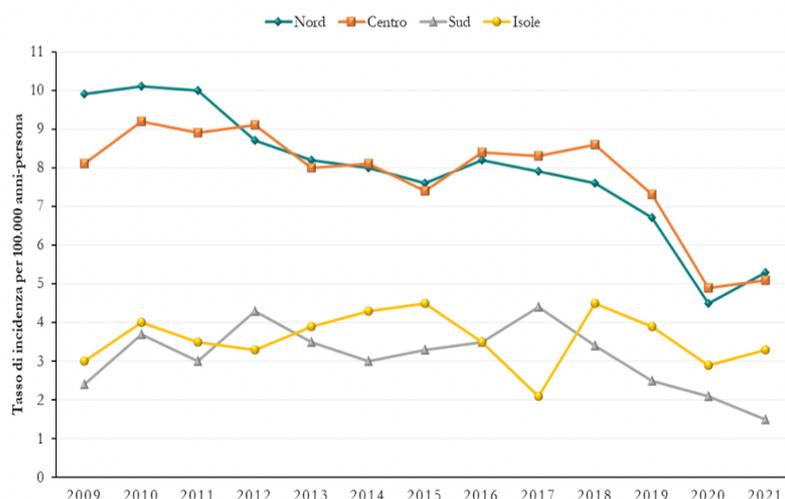
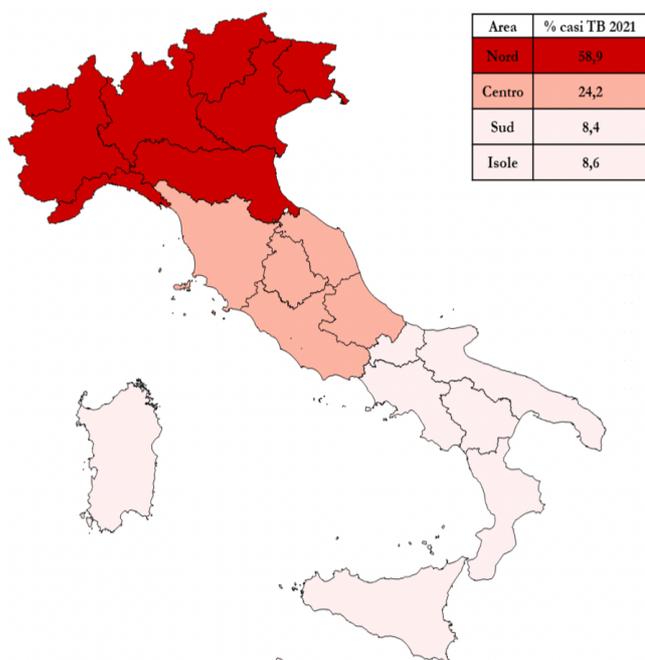
### 1.3.3 Situazione epidemiologica italiana

In Italia nel 2021, sono stati notificati 2480 casi (4 casi su 100.000 abitanti) di Tubercolosi, con un lieve aumento dell'8,4% rispetto al 2020 e una diminuzione del 25,9% rispetto l'anno 2019.

Il 57,9% dei casi (1437) si è verificato in individui di origine straniera.

In linea generale, le Regioni del Centro e del Nord Italia hanno registrato un tasso di segnalazione superiore rispetto a quello delle Regioni del Sud Italia e delle Isole.

In particolare, sono stati notificati 1.460 casi di tubercolosi nel Nord Italia (58,9% del totale), 600 nel Centro Italia (24,2%), 207 nel Sud (8,4%) e 213 nelle Isole (8,6%).



*Figura 9: Distribuzione dei casi di TB per macroarea geografica 2021*

Nel complesso, il 68% dei casi pari a 1686 diagnosi, sono state identificate come nuove segnalazioni in individui mai precedentemente sottoposti a trattamento per la tubercolosi, mentre il 65,5% dei casi, pari a 1406 individui, è stato sottoposto a test di suscettibilità ai farmaci. Tra coloro che sono stati sottoposti a tali test, si sono manifestati 44 casi di tubercolosi multiresistente (RR/MDR-TB), di cui 10, corrispondenti al 22,7%, erano casi pre-XDR-TB. (Ministero della salute., 2023)

Per quanto concerne il tasso di mortalità: nel periodo compreso tra il 2009 e il 2017 sono stati segnalati 254 decessi causati dalla Tuberculosis, di cui 31 si sono verificati nel 2017.

Nel corso del 2017, il tasso di mortalità registrato è stato di 0,05 decessi per 100.000 persone, diminuito del 28,6% rispetto al 2015 il cui tasso di decessi registrato era di (0,07 per 100.000).

Analizzando il periodo più esteso dal 2009 al 2021, emerge che la fascia di età 15-24 anni, situata nel Centro-Nord, ha presentato il tasso di notifica più elevato.

Nel periodo che va dal 2015 al 2017, questo tasso è aumentato ulteriormente, raggiungendo il valore di 15,4 casi per 100.000 abitanti nel 2017, registrando un incremento significativo del 77% rispetto al valore del 2009.

Le classi d'età 25-64 anni e  $\geq 65$  anni hanno invece mostrato un andamento in calo, con tassi di notifica annuale in media pari a rispettivamente 6,9 per 100.000 e 5,5 per 100.000.

La fascia di età a essere risultata meno colpita è stata quella 0-14 anni, con una media di 2,6 casi per 100.000.

Nel 2021, la fascia più colpita è stata quella tra 25-64 anni, rappresentando il 63,0% dei casi, un dato simile al 60,4% calcolato nel periodo 2009-2021.

(Ministero della salute., 2023)

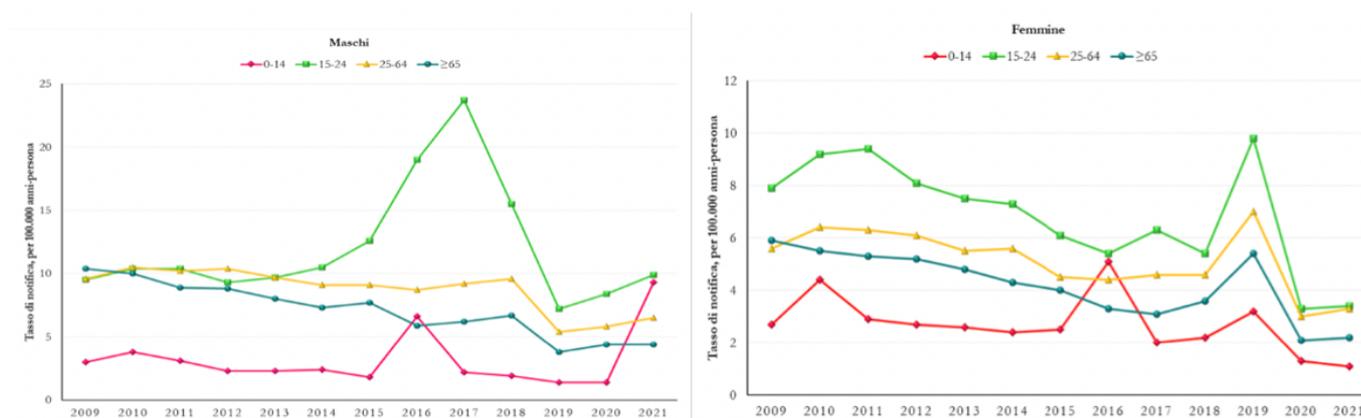


Figura 10: tasso di notifica di TB per sesso ed età 2009-2021

Nel periodo 2009-2021, la maggior parte dei casi segnalati tra individui di origine straniera proviene principalmente dall'Europa (7.807 casi, corrispondente al 31,1%), dall'Africa (5.645, pari al 22,5%) e dal Mediterraneo Orientale (5.364, rappresentanti il 21,3%). Negli ultimi cinque anni, si è osservato un declino nella proporzione di pazienti nati nella regione OMS Africana, passando dal 36,2% nel 2017 al 23,9% nel 2021. Similmente, la proporzione di casi di tubercolosi tra coloro nati in Europa è diminuita a partire dal 2012. Nel 2021 sono stati 361 casi (pari al 27,5%) i casi segnalati nati nel Mediterraneo Orientale, 314 (pari al 23,9%) in Africa, 282 (il 21,5%) in Europa, 146 (l'11,1%) nel Sud-Est Asiatico, 118 (il 9,0%) nelle Americhe, e 93 (pari al 7,1%) nel Pacifico Occidentale.

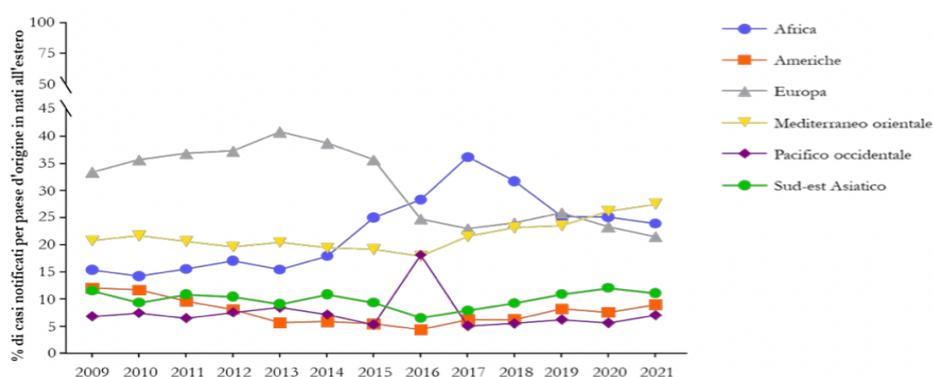


Figura 11: distribuzione dei casi di TB in soggetti non italiani 2009-2021

Nel corso del 2021, si è registrato il più elevato numero di casi notificati tra individui nati in diverse nazioni, la Romania (188 casi, pari al 14,3%), il Pakistan (143 casi, corrispondenti al 10,9%), il Senegal (113 casi, rappresentanti l'8,6%), il Marocco (111 casi, pari all'8,5%), la Somalia (80 casi, equivalenti al 6,1%), l'India (79 casi, costituendo il 6,0%), il Perù (70 casi, con il 5,3%) e le Filippine (61 casi, rappresentando il 4,6%). (Ministero della salute., 2023)

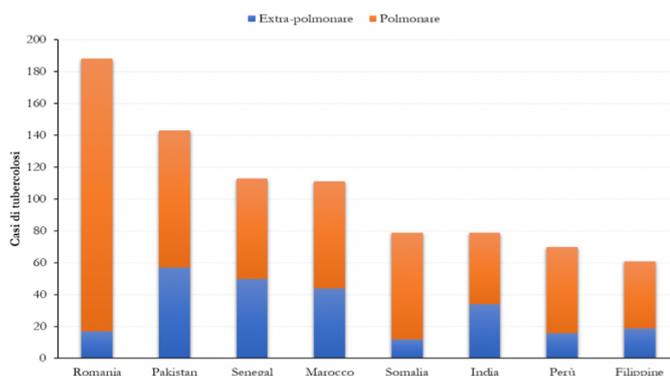


Figura 12: Casi di TB per sede anatomica in pazienti non italiani 2021

### 1.3.4 Situazione epidemiologica in Piemonte

Secondo i dati pubblicati da Seremi ASL-AL nel documento “la Tuberculosis in Piemonte (revisione 2022), in Piemonte nel 2020 e nel 2021 è stato segnalato il minor numero di notifiche di TB negli ultimi vent’anni con un tasso pari a 4,8 casi ogni 100.000 abitanti, molto inferiore rispetto a 7,4 che è il valore medio calcolato nel periodo 2012-2021.

Nel 2021 sono stati notificati in Piemonte 265 casi di Tuberculosis, pari a 6,2 casi ogni 100.000 abitanti, di cui la maggior parte circa 250 casi il 94% riguardano nuove diagnosi di malattia tubercolare.

Tra questi si conferma la prevalenza (61%) di stranieri provenienti dalla Romania o dal Marocco dove la TB è molto diffusa, sono 174 i casi di persone nate all’estero

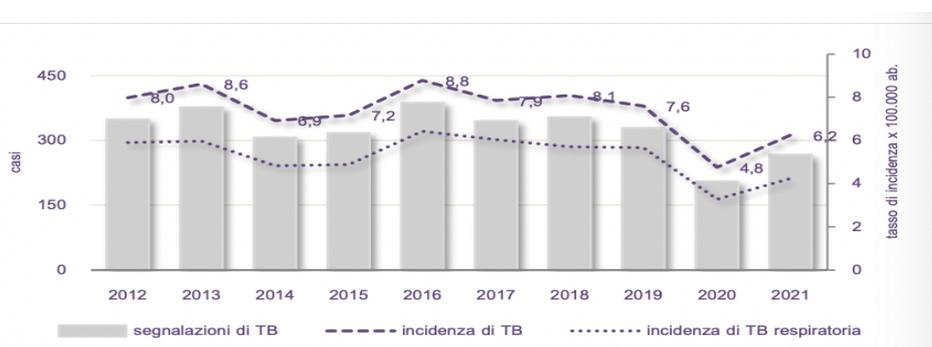


Figura 13: Tasso di incidenza di TB (2012-2021), (Seremi ASL-AL 2023)

La diminuzione del numero dei casi si osserva in tutte le Province del Piemonte.

E’ nella Provincia di Torino in cui si è concentrata la maggior parte dei casi che sono stati segnalati negli ultimi dieci anni (circa il 57%), con 285 segnalazioni pari a 10,4 casi su 100.000 abitanti, valore superiore rispetto all’anno precedente nel 2020 si è registrata una prevalenza di 8,7 casi su 100.000.

PROVINCIA DI RESIDENZA/DOMICILIO	INCIDENZA TUBERCOLOSI (tassi di incidenza x 100.000 ab. [limite inf./sup. 95%])		
	2019	2020	2021
ALESSANDRIA	30 (7,1)	15 (3,6)	30 (7,3)
ASTI	18 (8,4)	9 (4,2)	11 (5,3)
BIELLA	5 (2,8)	2 (1,1)	3 (1,8)
CUNEO	40 (6,8)	22 (3,8)	40 (6,9)
NOVARA	21 (5,7)	12 (3,3)	23 (6,3)
TORINO	195 (8,6)	125 (5,6)	147 (6,6)
VERBANO –CUSIO –OSSOLA	8 (5,0)	3 (1,9)	3 (1,9)
VERCELLI	6 (3,5)	6 (3,5)	5 (3,0)

Tabella 1: Tassi di incidenza Tuberculosis 2019-2021 (Seremi-ASL AL)

Nell'anno 2022 in Piemonte sono state segnalate 145 diagnosi di TB di pazienti nati all'estero (pari al 58% del totale dei casi), il cui 36% riguardano persone che sono originarie dalla Romania (27 casi) e Marocco (26 casi).

Sono state 104 le segnalazioni di tubercolosi di pazienti nati in Italia, 15 dei quali riguardavano persone con genitori di origine straniera (pari a 2,7 casi ogni 100.000 abitanti leggermente in aumento in confronto ai 2,4 casi del 2021).

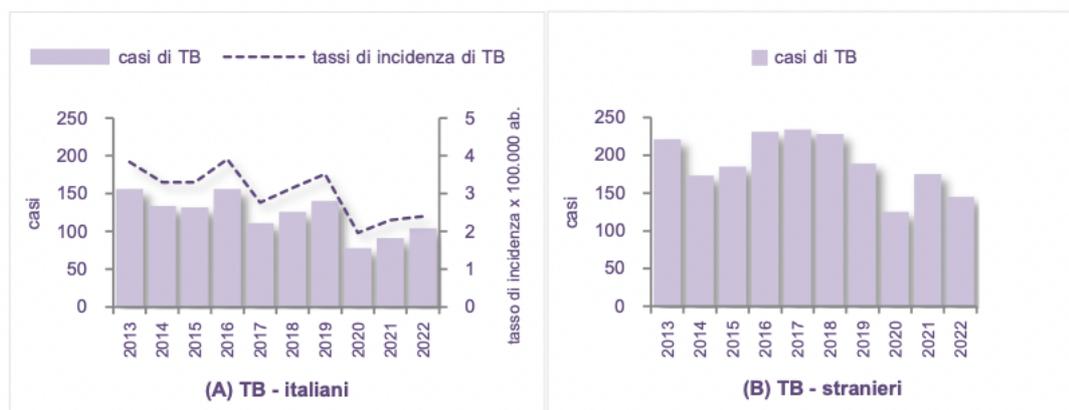


Figura 14: Andamento dei casi di TB per luogo di nascita (2013-2022)

La prevalenza della Tubercolosi varia a seconda della classe di età e dal luogo di origine.

Nel 2022, tra i bambini nati in Italia da genitori stranieri, sono stati segnalati 37 casi (corrispondenti al 23%) con un'età compresa tra 0 e 25 anni, mentre tra i bambini di cittadinanza italiana la frequenza si riduce a meno dell'1%. Per gli italiani, la fascia di età più colpita è quella superiore ai 64 anni, rappresentando il 61% dei casi, mentre per gli stranieri in questa fascia d'età la frequenza è di circa l'8%.

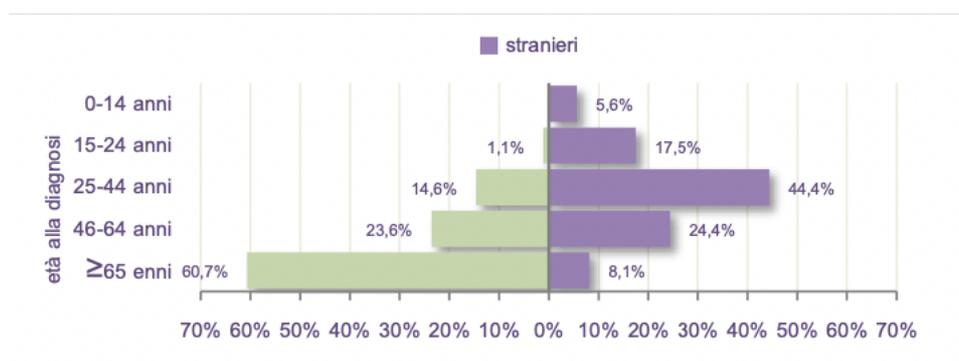


Figura 15: Percentuale dei casi di TB per luogo di nascita e per classi di età

## 1.4 FISIOPATOLOGIA DELLA TUBERCOLOSI

### 1.4.1 Modalità e rischio di infezione

Il bacillo tubercolare si trasmette principalmente per via aerea, tramite l'inalazione di goccioline rilasciate nell'ambiente durante atti come tosse e starnuti.

Si stima che ogni colpo di tosse possa liberare circa 3000 nuclei di goccioline bacillifere. (Fondazione Misi., 2016)

Le particelle più piccole, con diametro compreso tra 5 e 10  $\mu\text{m}$ , hanno la capacità di rimanere in sospensione nell'aria per diverse ore, favorendo l'inalazione nelle vie respiratorie in momenti successivi. (Malattie Infettive: Moroni et al., 2003)

Il rischio di acquisire l'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* dipende principalmente, ma non solo, da fattori esterni come il contatto probabile con un caso infetto, l'intimità del contatto, la durata dell'esposizione, il grado di contagiosità del paziente e l'ambiente in cui avviene il contatto.

## 1.5 ASPETTI CLINICI

La tubercolosi (TB) può coinvolgere diversi distretti dell'organismo ospite, ma la forma più significativa riguarda le vie respiratorie, sia per la sua elevata frequenza che per il suo ruolo nella diffusione del contagio. La trasmissione dell'agente eziologico, *Mycobacterium tuberculosis*, avviene attraverso colpi di tosse che rilasciano goccioline di saliva contenenti il patogeno. (Barry R Bloom et al., 2017)

Queste goccioline, quando inalate, possono propagare l'infezione.

La probabilità di sviluppare la malattia dopo l'infezione è intorno al 10%.

Tra coloro che sviluppano la malattia, il 50% manifesta la tubercolosi entro qualche anno, mentre il 50% può svilupparla nel corso della vita. I bacilli dormienti possono, infatti, riattivarsi nel corso degli anni, portando alla comparsa della malattia.

Nel restante 90% dei casi, in cui non si sviluppa la malattia attiva, si parla di infezione tubercolare, e questi individui possono ospitare il patogeno in vari stadi di replicazione.

Le forme più comuni di Tubercolosi extra-polmonare coinvolgono la pleura, il sistema nervoso, i linfonodi, le ossa e l'apparato urogenitale.

Inoltre, esiste anche una forma di Tuberculosis conosciuta come miliare, che può coinvolgere polmoni o altri organi del sistema.

I sintomi e i segni della tubercolosi includono febbre, sudorazioni notturne, perdita di peso e astenia. (Isabelle Suarez et al., 2019)

Nel caso della Tuberculosis delle vie respiratorie, la tosse rappresenta il sintomo più evidente, spesso accompagnato da espettorazione e, più raramente, emottisi.

Si considera contagioso il paziente affetto da tubercolosi bacillifera delle vie respiratorie con un'elevata carica batterica, rilevabile mediante esame microscopico. Tuttavia, è importante notare che il rischio di contagio persiste anche nelle forme che presentano una coltura positiva a bassa carica, che possono risultare negative all'esame microscopico.

(Amcli., rev 2023)

### 1.5.1 EVENTI CLINICI DELLA TUBERCOLOSI

Il contatto tra *Mycobacterium tuberculosis* e l'organismo ospite può portare a conseguenze cliniche molto varie. È fondamentale distinguere tra infezione e malattia, una distinzione rilevante per agenti infettivi che hanno sviluppato una simbiosi con l'ospite, dove solo una piccola percentuale di individui infetti sviluppa effettivamente la malattia.

Nel caso della tubercolosi, solo circa il 5-10% dei soggetti infetti sviluppa la forma attiva della malattia, mentre la maggioranza presenta un'evoluzione asintomatica dell'infezione. L'equilibrio che si instaura tra il microrganismo e l'ospite è influenzato da diversi fattori, tra cui lo stato immunitario dell'ospite che gioca un ruolo chiave.

Possiamo definire tre eventi principali che delineano la storia clinica della tubercolosi in un unico continuum temporale:

**-Infezione primaria asintomatica:** Questa fase è caratterizzata dal contatto iniziale con il microrganismo, durante il quale la maggior parte dei soggetti non sviluppa sintomi evidenti. La maggior parte delle persone infettate inizialmente da *Mycobacterium tuberculosis* non sviluppa la tubercolosi attiva.

Questo stato, in cui una persona infettata dal bacillo della tubercolosi non ha sviluppato la malattia attiva, è chiamato infezione latente da tubercolosi (LTBI). (Claudia Carranza et al., 2020)

L'organismo ospite può controllare l'infezione o limitare la sua diffusione. La sintomatologia clinica spesso è completamente assente.

Attualmente, esistono due categorie di test per la diagnosi dell'LTBI: i test cutanei alla tubercolina (TST) e i test di rilascio di interferone- $\gamma$  (IGRA).

(Jean Pierre Zellweger et al., 2020).

**-Tubercolosi primaria:** In alcuni casi, l'infezione primaria evolve in una forma di malattia attiva. Questo può includere sintomi come tosse persistente, febbre e malessere generale. La tubercolosi primaria può coinvolgere i polmoni o altri organi, a seconda della via di ingresso del microrganismo nell'organismo.

Per avviare l'infezione, i bacilli di *M. tuberculosis* devono essere fagocitati dai macrofagi alveolari. Se i macrofagi non riescono a uccidere i bacilli, questi si replicano all'interno delle cellule e alla fine provocano la morte del macrofago, spesso con l'assistenza dei linfociti CD8. La presenza di cellule infiammatorie attira ulteriori attenzioni, causando un accumulo polmonare che si manifesta come caratteristici tubercoli visibili nell'esame istologico.

Nelle prime fasi dell'infezione, alcuni macrofagi infetti migrano verso i linfonodi regionali (come quelli ilari e mediastinici), da qui possono accedere alla circolazione sanguigna. I microrganismi possono quindi diffondersi attraverso la circolazione ematica, preferenzialmente nelle regioni apicali-posteriori dei polmoni, nell'epifisi delle ossa lunghe, nei reni, nei corpi vertebrali e nelle meningi. Tuttavia, la diffusione ematogena è meno comune nei pazienti con immunità parziale dovuta alla precedente vaccinazione o a precedenti infezioni naturali con *M. tuberculosis*.

(Edward A.Nardell., 2022)

**-Tubercolosi post-primaria:** In questa fase, l'infezione può riemergere dopo un periodo di latenza, dando luogo a una malattia attiva. Questo può verificarsi a causa di una ridotta immunità dell'ospite, che consente al microrganismo di riattivarsi.

## 1.6 DIAGNOSI

La diagnosi della tubercolosi si basa su diversi elementi, inclusi i sintomi/segni di malattia, diagnostica per immagini e indagini microbiologiche. Questo processo può essere particolarmente complesso nei soggetti di età pediatrica o immunodepressi.

### 1.6.1 CRITERI MICROBIOLOGICI

La richiesta di esami microbiologici è appropriata quando c'è un elevato sospetto di tubercolosi, basato su quadro clinico e radiologico.

Per la diagnosi di TB polmonare, si raccomanda l'utilizzo del test molecolare per la ricerca di frammenti specifici del genoma di *M. tuberculosis complex*.

Questi test sono stati approvati dall'OMS e dal mercato europeo in base alle loro caratteristiche di sensibilità e specificità.

L'esame microscopico per la ricerca di bacilli alcol-acido resistenti (BAAR) può essere impiegato per valutare la carica batterica e monitorare la terapia, ma ha limitazioni di sensibilità e specificità.

La coltura, eseguita dopo la decontaminazione del campione, riveste un ruolo cruciale nel monitoraggio della risposta alla terapia. La negatività di un test di amplificazione in presenza di risultati positivi alla microscopia rende meno probabile la diagnosi di TB, suggerendo un'infezione da micobatteri non tubercolari (NTM).

Al contrario, un test di amplificazione positivo, in presenza di un esame microscopico risultato negativo può supportare la diagnosi, specialmente in presenza di un elevato sospetto clinico.

In caso in cui venga rilevata la resistenza alla rifampicina, si raccomanda la ricerca molecolare delle resistenze all'isoniazide e ai fluorochinoloni. Le tecniche basate sul sequenziamento di nuova generazione possono essere utilizzate per identificare direttamente dal campione clinico e diretto quali sono i determinanti di resistenza ai farmaci. Attualmente sono disponibili test molecolari basati sulla Next-Generation Sequencing (NGS), eseguibili su campioni risultati positivi alla microscopia, che forniscono informazioni sulla presenza di resistenze ai principali farmaci antitubercolari.

Questi test molecolari rappresentano un avanzamento significativo nella diagnosi della tubercolosi e nella valutazione della resistenza ai farmaci.

Nonostante l'innovazione dei test molecolari, il test di sensibilità fenotipico è ancora consigliato per tutti i pazienti con risultati di coltura positiva. In situazioni in cui si verifica resistenza alla rifampicina o di resistenza simultanea a isoniazide e rifampicina, diventa essenziale valutare la sensibilità anche agli altri farmaci utilizzati nel trattamento della tubercolosi farmaco-resistente (TB-MDR), come fluorochinoloni, bedaquilina, linezolid, clofazimina e nitroimidazoli (pretomanid e delamanid). (AMCLI., Rev 2023)

### **1.6.2 CRITERI RADIOLOGICI**

Le indagini radiologiche rivestono un ruolo importante nel supportare e confermare i casi di sospetto clinico di tubercolosi.

Nelle forme polmonari, la radiografia standard del torace rappresenta una metodica diagnostica poco costosa, rapida e sensibile per identificare lesioni tubercolari.

Il quadro radiografico tipico delle forme post-primarie include opacità, escavazioni e infiltrazioni dei lobi superiori, spesso sotto-claveari, o dei segmenti apicali dei lobi inferiori.

La tomografia computerizzata (TC) del torace a strato sottile può essere utilizzata come ausilio diagnostico per caratterizzare in modo più dettagliato le alterazioni del parenchima polmonare.

Per valutare l'interessamento linfonodale, talvolta può essere necessario richiedere l'impiego del mezzo di contrasto durante la TC.

Per quanto riguarda le forme extra-polmonari (ad esempio addominale, sistema nervoso centrale, genito-urinario, linfonodale), si possono impiegare diverse metodiche radiologiche, tra cui TC, risonanza magnetica (RM) ed ecografia, a seconda del distretto coinvolto. La scelta della metodica dipende dalla specificità richiesta per ciascun distretto anatomica e dalle caratteristiche cliniche del paziente.

## 1.6.2 CRITERI IMMUNOLOGICI

Le persone colpite da infezione latente da *Mycobacterium tuberculosis* (LTBI) ospitano il patogeno nel loro organismo senza sviluppare la tubercolosi attiva e non rappresentano un rischio di trasmissione dell'infezione a individui che possono essere suscettibili.

Tuttavia, in alcuni individui infetti, la transizione da LTBI a tubercolosi attiva può verificarsi in qualsiasi momento.

Di conseguenza, l'identificazione delle persone con LTBI è di fondamentale importanza poiché ciò permette di prevenire il passaggio verso la tubercolosi attiva, sottolineando l'importanza di strategie preventive nella gestione complessiva della tubercolosi latente. (Swetalina Pradhan et al., 2021)

I test disponibili per la diagnosi indiretta e/o sorveglianza della tubercolosi latente (LTBI) sono due, entrambi basati sull'identificazione di una risposta immunitaria contro gli antigeni di MT. Questo tipo di diagnosi presuppone che l'organismo abbia sviluppato una risposta immunitaria a seguito di un precedente contatto con il batterio causante della tubercolosi (Jean Pierre Zellweger et al., 2020):

### 1) Test cutaneo alla tubercolina (TST) o Test intradermico Mantoux:

svolge un ruolo significativo sia a livello diagnostico che epidemiologico.

Tuttavia, presenta alcune limitazioni.

Il TST può produrre risultati falsamente positivi a causa di infezioni da micobatteri atipici o a seguito di una precedente vaccinazione con il BCG.

D'altro canto, deficit nell'immunità cellulare o un periodo troppo breve dall'esposizione a *Mycobacterium tuberculosis* (periodo finestra) possono portare a risultati falsamente negativi del test Mantoux.

Un fenomeno noto è l'"effetto booster": in alcuni individui, specialmente in caso di infezioni datate, la realizzazione di un primo test cutaneo, inizialmente risultato negativo, può stimolare la capacità di reagire alla tubercolina, causando una reazione positiva ai test successivi. Per questo motivo, in circostanze specifiche, come nel caso del personale sanitario durante l'assunzione, si prevede che nei soggetti che ottengono risultati negativi al primo test Mantoux, venga eseguito un secondo test a distanza di 1-3 settimane al fine di identificare eventuali positivi riconosciuti attraverso

l'effetto booster. Questa procedura mira a migliorare la sensibilità del test nella rilevazione di infezioni latenti da *M. tuberculosis*. (Amcli- Diagnosi Immunologica rev 2023).

Il test valuta la risposta immunitaria cellulo-mediata (ipersensibilità) al derivato proteico purificato PPD (nota come Tubercolina di Koch).

Questo test è caratterizzato da un costo contenuto e prevede un'iniezione intradermica che si esegue iniettando una dose standard di 5 unità di tubercolina (0.1 ml).

La valutazione della risposta al test avviene misurando le dimensioni della reazione cutanea, generalmente tra 48 e 72 ore dopo l'iniezione. Una reazione è considerata positiva se si osserva un infiltrato di almeno 10mm di diametro (Centro Diagnostico Italiano., 2019)

E' importante sottolineare che una risposta positiva indica un'ipersensibilità al bacillo di Koch, ma non fornisce informazioni sulla presenza di malattia attiva. Pertanto, è utilizzato come indicatore di una pregressa esposizione al patogeno. (Ky Loh., 2011)

Inoltre, la somministrazione accidentale per via sottocutanea, anziché intradermica, oltre a determinare l'assenza di reazione locale (con possibile interpretazione del test "falso negativo"), può provocare anche delle reazioni avverse come febbre e/o una reazione infiammatoria acuta, in soggetti ipersensibili a livello locale si possono verificare eritema ed edema accompagnati da tensione e prurito.



*Figura 16: Test Tubercolinico cutaneo*

## 2) Test di rilascio dell'interferone gamma (IGRA):

La risposta immunitaria contro *Mycobacterium tuberculosis* coinvolge diversi sottoinsiemi di cellule, tra cui macrofagi e linfociti T.

I macrofagi rappresentano un'importante prima linea di difesa contro l'infezione, ma i bacilli di *M. tuberculosis* possono sfuggire al sistema immunitario, stabilendosi all'interno degli stessi macrofagi.

La citochina interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) gioca un ruolo chiave nell'eliminazione di *M. tuberculosis*, poiché attiva la produzione di intermedi reattivi di ossigeno e azoto nei macrofagi. Questi composti dannosi contribuiscono alla distruzione dei batteri patogeni. (Swetalina Pradhan et al., 2021)

Le cellule T CD4, che riconoscono gli antigeni di *M. tuberculosis*, sono responsabili della produzione di IFN- $\gamma$ , attivando così i macrofagi infettati e contribuendo all'eliminazione dei bacilli, controllandone la crescita.

La risposta immunitaria adattativa, orchestrata dalle cellule T CD4, è fondamentale per contrastare l'infezione.

Gli IGRA (Interferon-Gamma Release Assays) sono test che valutano la presenza di risposte immunitarie specifiche dirette contro gli antigeni di *M. tuberculosis* nel sangue. Questi test misurano principalmente la presenza di cellule T di memoria effettrici, indicando una precedente esposizione con i bacilli.

Gli IGRA forniscono una misura indiretta dell'esposizione a *M. tuberculosis* e della memoria immunologica sviluppata in risposta all'infezione. (C Lange et al., 2009).

Questi test QuantiFERON®-TB PLUS, sono stati sviluppati recentemente e prevedono l'uso di sangue periferico raccolto direttamente in 4 provette, (1 ml per provetta) (Amcli- Diagnosi Immunologica., rev 2023).

Dopo il prelievo, le provette vengono incubate per un periodo compreso tra 16 e 24 ore a una temperatura di 37°C, entro le prime 16 ore dal momento del prelievo del sangue.

Questa fase di incubazione è fondamentale per stimolare eventuali cellule T di memoria presenti nel campione di sangue a rilasciare interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) in risposta agli antigeni di *Mycobacterium tuberculosis*.

Successivamente, il sangue viene centrifugato e il plasma così ottenuto viene utilizzato per valutare la concentrazione di IFN- $\gamma$  mediante un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). L'ELISA è una tecnica di laboratorio che consente di rilevare la presenza e la quantità di una specifica proteina, in questo caso l'IFN- $\gamma$ , nel campione di plasma.

Infine, i risultati ottenuti vengono interpretati seguendo le raccomandazioni del produttore del test. Questa interpretazione consente di determinare se vi è una risposta immunitaria specifica a *Mycobacterium tuberculosis*, indicando così una possibile esposizione pregressa al batterio. (Swetalina Pradhan et al., 2021)

Tra i Vantaggi del test di rilascio dell'interferone gamma (IGRA) vi sono:

- ❖ **Visita unica:** Il test IGRA può essere eseguito in una singola visita, a differenza del test cutaneo tubercolinico (TST), che richiede due visite.
- ❖ **Non influenzato dal precedente stato di vaccinazione BCG:** A differenza del TST, l'IGRA non è influenzato dal fatto che una persona sia stata o meno vaccinata con il Bacillus Calmette-Guérin (BCG).
- ❖ **Non dipendente dall'osservatore:** La lettura del risultato del test IGRA non è soggetta alla soggettività dell'osservatore, come potrebbe essere il caso con il TST, dove la valutazione è basata su eritema o indurimento della pelle

Tra gli svantaggi invece, troviamo:

- **Costo elevato:** il test IGRA è generalmente più costoso rispetto al TST, il che può rappresentare un limite nei paesi a basso e medio reddito, come indicato dalle linee guida dell'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS).
- **Falsi positivi e scarso valore predittivo positivo in regioni a bassa prevalenza:** In aree con bassa prevalenza di infezione tubercolare, l'IGRA può produrre falsi positivi e avere un valore predittivo positivo inferiore.
- **Vincoli temporali per l'analisi dei campioni di sangue:** I campioni di sangue devono essere analizzati entro un determinato periodo, generalmente compreso tra 8 e 30 ore dalla raccolta, per garantire che le cellule immunitarie siano ancora vitali, il che può limitare la flessibilità logistica.
- **Possibili errori nella raccolta, trasporto e esecuzione del test:** Errori nella raccolta, nel trasporto dei campioni di sangue o nell'esecuzione e interpretazione del test possono influire sull'accuratezza dell'IGRA

## 1.7 TERAPIA

I Farmaci usati per il trattamento della tubercolosi e la relativa classificazione sono elencati nella tabella 2 sottostante.

GRUPPO	FARMACO
I linea	Rifampicina Rifapentina, Rifabutina
	Isoniazide
	Etambutolo (Gruppo C)
	Pirazinamide (Gruppo C)
Gruppo A	Levofloxacina
	Moxifloxacina
	Bedaquilina
	Linezolid
Gruppo B	Clofazimina
	Cicloserina
Gruppo C	Delamanid
	Imipenem-cilastina
	Meropenem
	Amikacina
	Streptomina
	Etionamide
	Protionamide
Acido p-aminosalicilico	

Tabella 2: Farmaci antitubercolari (Amcli., rev 2023)

Il trattamento della tubercolosi si divide in due fasi di terapia "fase intensiva" e "fase di continuazione" questo per garantire un trattamento efficace e prevenire la resistenza ai farmaci. Sono terapie molto lunghe che possono variare dai 6 -9 mesi fino a 12-18 mesi (Centro diagnostico italiano., 2019) in casi particolari, durante il quale i pazienti vengono continuamente monitorati e questo è fondamentale per garantire il successo terapeutico e nella gestione di eventuali complicanze.

- Fase intensiva= Durante questa fase, il paziente riceve una combinazione di quattro antibiotici - Isoniazide, Rifampicina, Etambutolo e Pirazinamide - al fine di eliminare attivamente l'infezione. Questa fase solitamente dura diversi mesi e viene monitorata attraverso vari esami diagnostici, tra cui la valutazione della resistenza ai farmaci, esami colturali, presenza o assenza di lesioni cavitari alla radiografia. (Jeffrey A Tornheim et al., 2019)

- Fase di continuazione è un'ulteriore fase di mantenimento che dura 4-7 mesi ed è raccomandata per la maggior parte dei pazienti. Durante questa fase il regime terapeutico viene adattato in base ai risultati clinici di laboratorio e potrebbe includere delle modifiche sia nella scelta degli antibiotici da utilizzare sia nella durata del trattamento.

(Linee Guida WHO., 2017)

La terapia viene adattata in base alle specifiche esigenze di ciascun paziente, migliorandola possibilità di guarigione e riducendo così i rischi associati alla tubercolosi. (Francesco Centorrino, 2020)

La resistenza agli antibiotici è una preoccupazione significativa, motivo per il quale è stata adottata la strategia DOT (Terapia Osservata Direttamente) introdotta negli anni '90, ha dimostrato di essere un approccio efficace per ridurre la durata del trattamento e prevenire la resistenza agli antibiotici. Il coinvolgimento attivo del personale sanitario nell'osservare direttamente l'assunzione dei farmaci da parte del paziente contribuisce al successo della terapia. (Ministero della salute., 2023)

In presenza di ceppi multiresistenti, dove i farmaci di prima linea come rifampicina e isoniazide non sono efficaci, si ricorre ai farmaci di seconda linea come streptomina, kanamicina e fluorochinoloni, e nel caso di una resistenza estesa si ricorre a farmaci come bedaquilina, delamanid e sutezolid, che offrono nuove opportunità di trattamento.

Nei pazienti con tubercolosi polmonare in terapia con farmaci di prima linea ed esame microscopico positivo all'inizio del trattamento, la WHO raccomanda l'esecuzione dell'esame microscopico su espettorato alla fine della fase di induzione del trattamento:

- \* Nel caso in cui l'esame microscopico risulta positivo, deve essere ripetuto alla fine del terzo mese di trattamento. Se anche questo risultasse positivo, è raccomandata l'esecuzione dell'esame colturale e del DST (drug sensibility test) test di sensibilità ai farmaci. L'esame colturale, eseguito in questa fase del trattamento, consente di individuare la presenza di ceppi farmaco-resistenti, evitando così di attendere il quinto mese di trattamento per apportare eventuali modifiche terapeutiche. Infatti, il rilevamento in qualunque fase del trattamento di ceppi farmaco-resistenti è sufficiente per dichiarare il fallimento terapeutico e modificare la terapia.
  
- \* Qualora l'esame microscopico risulti negativo, deve essere ripetuto alla fine del quinto e del sesto mese di trattamento. Se uno dei due esami risultasse positivo, si raccomanda l'esecuzione dell'esame colturale e del DST. In caso di positività in questa fase, si considera un fallimento terapeutico, il che richiede l'inizio di un nuovo trattamento antitubercolare.

(WHO Treatment of Tuberculosis, Guidelines., 2010)

## 1.8 PREVENZIONE

La creazione di un vaccino efficace contro la tubercolosi (TBC) rappresenta una priorità globale, ma è stata complicata dalla conoscenza incompleta dell'immunità protettiva contro la malattia.

Fino ad ora, gli sforzi per lo sviluppo di vaccini si sono concentrati principalmente sulla prevenzione della malattia di TBC anziché sull'infezione stessa.

(Thomas R. Hawn et al., 2014)

Dal 1921 l'unico vaccino anti-tubercolare autorizzato contro la tubercolosi è il BCG (Bacillo di Calmette-Guerin), che contiene il ceppo vivo attenuato di *M.bovis*.

(Elisa Terracciano.,2020).

Questo vaccino si è dimostrato efficiente principalmente nei bambini piccoli e nelle forme gravi di Tubercolosi (Anca Vasiliu., et al 2023)

Tuttavia, gli studi sull'efficacia dei BCG indicano che la vaccinazione riduce in modo significativo il rischio di contrarre la tubercolosi, con una riduzione media del 50% (Timothy F.Brewer., 2000).

Nonostante ciò, si è dimostrato inefficace nel controllo dell'epidemia globale.

Per raggiungere l'obiettivo di porre fine all'epidemia globale di tubercolosi entro il 2035, è essenziale che vengano implementati nuovi strumenti, che le pratiche di attuazione vengano ottimizzate ed è importante che vengano assicurati finanziamenti adeguati per i programmi di controllo della tubercolosi.

Lo sviluppo e la ricerca di nuovi trattamenti e vaccini, insieme a un potenziamento dei sistemi di salute pubblica, sono fondamentali per affrontare la complessità della tubercolosi e ridurre il suo impatto sulla salute globale.

(Madhukar Pai et al., 2016).

## 2 STUDIO

### 2.1 SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio, iniziato nel novembre 2022, ha coinvolto l'analisi in NGS di 58 campioni al fine di fare una valutazione preliminare sull'utilizzo in routine del Targeted Sequencing (tNGS) per l'identificazione e la valutazione delle farmaco-resistenze di *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC). Si è inoltre valutato l'impatto di tale approccio sull'identificazione dei micobatteri non tubercolari (NTM) all'interno del laboratorio di Microbiologia clinica dell'AOU AL.

Lo scopo è stato quello di valutare:

- Lo studio delle informazioni aggiuntive fornite dall'antibiogramma molecolare di nuova generazione (NGS) rispetto all'antibiogramma fenotipico, nonché l'analisi sulla riduzione del Tempo di Refertazione (TAT)
- Il possibile utilizzo dell'antibiogramma molecolare (NGS) in previsione di una eventuale sostituzione dell'antibiogramma fenotipico esclusivamente per i Ceppi Wilde-Type dei Micobatteri tubercolari
- Identificazione dei Micobatteri non Tubercolari (NTM) e Confronto dei risultati con il Test Line Probe Assay LPA.
- La costruzione di un referto diagnostico di antibiogramma genotipico basato sul tNGS

## 2.2 MATERIALI E METODI: PROCEDURE DI LABORATORIO

### 2.2.1 FASE PREANALITICA

Il processo diagnostico delle infezioni da micobatteri è strettamente correlato alla valutazione del "pre-test", ossia la probabilità che un paziente sia effettivamente affetto da un'infezione che è stata causata dal microrganismo in esame.

Nel contesto delle infezioni polmonari, la manifestazione dei classici sintomi quali febbre, sudorazioni notturne, tosse prolungata, emottisi o sintomi correlati come l'espettorazione e la perdita di peso, riveste un ruolo è fondamentale.

L'associazione di tali sintomi con caratteristiche radiologiche tipiche costituisce un indicatore di un'infezione polmonare da micobatteri.

Inoltre, è importante considerare che la corretta procedura di raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni provenienti dalla sede anatomica sospetta dell'infezione è essenziale per garantire l'affidabilità dei risultati.

Pur potendo richiedere procedure invasive, questa pratica contribuisce in modo significativo alla precisione del processo diagnostico.

Il corretto prelievo del campione per l'analisi microbiologica richiede una rigorosa attenzione alle diverse procedure al fine di garantire l'affidabilità dei risultati diagnostici.

È essenziale che il prelievo venga eseguito in modo sterile per prevenire contaminazioni che potrebbero compromettere l'integrità dei risultati dell'analisi microbiologica.

È inoltre importante che il materiale raccolto sia in quantità sufficiente utilizzando dei contenitori monouso sterilizzati. Ogni contenitore deve essere accuratamente etichettato con dati anagrafici del paziente, il tipo di materiale, la sede di prelievo, e la data e l'ora di raccolta.

(Amcli., rev 2023)

TIPO DI CAMPIONE	REQUISITI	ISTRUZIONI SPECIFICHE	NON IDONEI
<b>Aspirato gastrico</b>	≥5-10 mL raccolto al mattino dopo almeno 8 ore di digiuno, per 3 giorni consecutivi	Neutralizzazione con carbonato di sodio	Campioni non neutralizzati
<b>Broncoaspirato, BAL, aspirato trans-tracheale</b>	≥3 mL	Disinfezione accurata del broncoscopio	
<b>Espettorato</b>	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
<b>Espettorato indotto</b>	5-10 mL raccolto al mattino, per 3 giorni consecutivi	Specificare che si tratta di espettorato indotto	
<b>Feci</b>	3-5 g in contenitore senza conservanti	Non idoneo per colturale di TB, utilizzabile per determinazione molecolare se processato in modo adeguato	
<b>Linfonodo</b>	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
<b>Liquidi cavitari: pleurico, pericardico, peritoneale</b>	≥15 mL in provetta sterile con citrato trisodico	Per la diagnosi di pleurite tubercolare sono più indicati biopsia pleurica e espettorato indotto	
<b>Liquor</b>	≥2 mL		
<b>Materiale da lesione cutanea</b>	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
<b>Materiale necrotico-ascessuale</b>	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
<b>Midollo emopoietico</b>	La quantità massima possibile direttamente nel flacone da emocoltura specifico per micobatteri, o in provetta con citrato trisodico		Campione coagulato o raccolto con EDTA
<b>Tessuto o biopsia</b>	≥ 1 g in contenitore senza fissativo o conservante	Aggiungere una piccola quantità di fisiologica sterile	Campioni in fissativi, campioni inclusi in paraffina
<b>Sangue mestruale</b>	Alcuni mL raccolti in provetta con eparina al 2°-3° giorno del flusso mestruale	Preferibilmente eseguire curettage dell'endometrio	Campione coagulato
<b>Sangue periferico</b>	Direttamente nel flacone da emocoltura specifico per micobatteri	Almeno 2 prelevati contemporaneamente o entro le 24 ore	Campione coagulato o raccolto con EDTA
<b>Urina</b>	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

Tabella 3: Campioni per la ricerca dei micobatteri (Amcli., rev 2023)

## 2.2.3 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:

### DECONTAMINAZIONE

I micobatteri mostrano una crescita lenta, con tempi variabili per la formazione e la comparsa delle colonie, che possono richiedere da pochi giorni a settimane, a seconda della specie e delle condizioni di incubazione. La gestione dei campioni biologici per la coltura distingue tra quelli provenienti da siti sterili e quelli contaminati dalla flora residente.

I campioni contaminati necessitano di procedure di decontaminazione, omogeneizzazione e concentrazione, mentre quelli sterili richiedono solo la concentrazione, a meno che non si sospetti un'infezione da altri batteri.

Per i campioni dalle basse vie aeree, non sono richiesti trattamenti diversi dalla decontaminazione standard.

Il processo di decontaminazione ha l'obiettivo di ridurre al minimo la carica microbica contaminante, evitando interferenze con la crescita dei micobatteri. Il metodo più comune utilizza N-acetil-L-cisteina (NALC) come fluidificante e idrato di sodio (NaOH al 2%) come decontaminante. L'efficacia della decontaminazione deve essere monitorata, mantenendo la percentuale di contaminazione tra il 3% e il 5%.

Nei terreni liquidi, è importante controllare la contaminazione, che non dovrebbe superare il 7-8% nei materiali respiratori. In caso di contaminazione eccessiva, è possibile applicare una seconda decontaminazione con NaOH al 4% prima di un nuovo inoculo. Questi dettagli operativi sono essenziali per garantire risultati accurati nelle analisi microbiologiche dei micobatteri.

(Amcli., rev 2023)

## 2.3 ESAME MICROSCOPICO

L'esame microscopico, sebbene rapido ed economico, presenta limitazioni significative nella diagnosi delle micobatteriosi. La sua bassa sensibilità (25%) lo rende efficace solo in presenza di un numero elevato di micobatteri (10<sup>4</sup> bacilli/mL), mentre la bassa specificità è dovuta alle proprietà tintoriali comuni ad altri microorganismi. Questo rende l'esame microscopico non più utilizzato come test iniziale per diagnosticare le micobatteriosi.

La colorazione dei micobatteri è resa difficile dalla presenza elevata di lipidi nella parete cellulare, rendendoli poco colorabili con la colorazione di Gram.

Tuttavia, in commercio esistono dei coloratori automatici che rappresentano una soluzione avanzata per il processamento efficiente di un grande numero di campioni.

Questi sistemi sono progettati per garantire una standardizzazione nel processo di colorazione, riducendo la variabilità operatore e migliorando la riproducibilità dei risultati:

- ❖ La colorazione di Ziehl-Neelsen e quella di Kinyoun sono entrambe tecniche di colorazione acida-resistente che si basano sull'uso di carbolfucsina:
  - ◆ Nel caso della Ziehl-Neelsen a caldo, l'osservazione con obiettivo 100x ad immersione mostra i BAAR di colore rosso, mentre gli altri batteri e lo sfondo appaiono azzurro-blu.
  - ◆ Mentre, la colorazione di Kinyoun a freddo segue un principio simile, con BAAR rossi su uno sfondo azzurro-blu.
- ❖ La terza tecnica, la colorazione fluorocromica con auramina, utilizza un metodo diverso per evidenziare i BAAR. L'osservazione deve avvenire entro 24 ore con un microscopio a fluorescenza o a LED utilizzando obiettivi 20x o 40x, permettono di visualizzare i BAAR che appaiono fluorescenti giallo-arancio su uno sfondo scuro.

È importante notare che la fluorescenza può decadere nel tempo; pertanto, è necessaria una conservazione del vetrino al buio e a 2-4°C fino alle 24 ore successive.

La lettura del vetrino deve comprendere l'osservazione di diversi campi microscopici, e il metodo di lettura deve consentire l'osservazione di una parte significativa del campione. I micobatteri tubercolari appaiono come bastoncini lunghi e sottili, talvolta ricurvi, mentre i micobatteri non tubercolari possono presentare forme pleiomorfe, inclusi cocci, forme allungate e occasionalmente forme ramificate, queste ultime tipiche di *Nocardia* sp. L'utilizzo di microscopi a fluorescenza o LED può aumentare la sensibilità e ridurre i costi rispetto ai tradizionali microscopi a fluorescenza.

(Manuale tecnico per la diagnosi Microbiologica della Tuberculosis)

BAAR OSSERVATI PER COLORAZIONE A BASE DI:			REFERTO
CARBOLFUCSINA Obiettivo 100x	AURAMINA Obiettivo 20x	AURAMINA Obiettivo 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 ++++

*Tabella 4: Schema di refertazione dell'esame microscopico (AMCLI., rev 2023)*

## 2.4 ESAME COLTURALE

Secondo gli standard internazionali per l'isolamento dei micobatteri si raccomanda l'utilizzo sia di terreni liquidi sia di terreni solidi, inoltre la crescita dei micobatteri avviene normalmente a temperature comprese tra 35-37°C ma per alcune specie sono richieste temperature diverse come 30°C o 42°C. Come detto precedentemente, le colture solide e liquide possono essere eseguite a partire da qualsiasi tipo di materiale biologico purché correttamente trattato (trattamenti di decontaminazione, omogenizzazione). La scelta del terreno è influenzata da più fattori ed il principale è il tipo di campione da esaminare: se partiamo da campioni provenienti da siti sterili utilizzeremo dei terreni non selettivi mentre se partiamo da campioni fortemente contaminati utilizzeremo dei terreni selettivi dato che spesso la decontaminazione non riesce ad eliminare tutta la flora contaminante presente.

### Coltura in terreno solido

I terreni solidi utilizzati per la coltura di micobatteri includono 3 varianti:

✘ Löwenstein-Jensen (LJ) (Figura 17):

- Terreno a base di uova con l'aggiunta di verde malachite.
- La verde malachite agisce come inibitore di batteri gram-positivi e fungine, facilitando la crescita selettiva dei micobatteri.

✘ Middlebrook 7H10 e 7H11 (Figura 18):

- Terreni agarizzati utilizzati per la coltura di micobatteri.
- Offrono un ambiente nutritivo adatto alla crescita dei micobatteri, fornendo nutrienti come gli estratti di carne e gli aminoacidi.
- Sono particolarmente utilizzati per la coltura di micobatteri che richiedono una maggiore nutrizione e consentono un isolamento più efficace.



Figura 17: Terreno Lowesten Jensen



Figura 18: Terreno Middlebrook 7H10 e 7H11

I campioni iniziali, sottoposti a omogenizzazione e decontaminazione, vengono successivamente inoculati nei terreni solidi attraverso l'aggiunta di una piccola quantità di campione omogeneizzato alle provette contenenti terreno. Durante i primi giorni di incubazione, le provette vengono mantenute inclinate per favorire una distribuzione uniforme del materiale sulla superficie del terreno. In questa fase iniziale, il tappo della provetta viene lasciato allentato per consentire l'evaporazione della parte liquida dell'inoculo.

Una volta che il terreno è completamente asciutto, il tappo della provetta viene serrato e l'incubazione prosegue in posizione verticale. Si raccomanda di incubare le provette per almeno 8 settimane, con la possibilità di prolungare l'incubazione fino a 12 settimane, specialmente per micobatteri con caratteristiche di crescita particolarmente lenta.

È importante monitorare settimanalmente i terreni solidi per rilevare la presenza di crescita micobatterica e di eventuali contaminanti. In caso di colonie sulla superficie, è necessario preparare un vetrino per differenziare i bacilli alcol-acido-resistenti, caratteristici dei micobatteri, dagli eventuali contaminanti.



Figura 19: Crescita in coltura su terreno Solido LJ di *Mycobacterium Tuberculosis*

### *Coltura in terreno liquido*

I terreni liquidi per micobatteri in commercio prevedono l'utilizzo di apparecchi automatici per la lettura e per l'incubazione, e il rilevamento di prodotti metabolici microbici con metodiche sensibili e automatizzate. Il sistema automatico più diffuso in Italia e nel mondo è il BACTECT MGIT 960 TB System che utilizza provette contenenti il terreno MGIT (Figura 20) a cui bisogna aggiungere un supplemento formato da una miscela di antibiotici (PANTA) che lo rende selettivo per micobatteri e da un arricchimento (OADC), questo per rendere il brodo di crescita maggiormente selettivo per i micobatteri.

Lo strumento ha il duplice ruolo di incubatore e di lettore in continuo delle provette MGIT di coltura e antibiogramma dei micobatteri.

È formato da 3 cassette ciascuno composto da 320 posizioni (suddivise in 16 righe e 20 colonne, per ciascuna colonna a sinistra ci sono provette di calibrazione) e sul lato esterno di ogni cassetto c'è un sistema di segnalazione dello status dei campioni interni al cassetto, questo può essere positivo, negativo o errore, ed altrettanti segnali di status sono presenti in corrispondenza di ciascuna posizione per guidare l'operatore nel suo lavoro.

La struttura dello strumento, la grandezza delle posizioni e dei flaconi MGIT rendono questo sistema adattabile e versatile, oltre al fatto che permette di leggere in contemporanea, con un solo modulo e come nessun'altro sistema, fino a 960 flaconi e quindi di gestire la routine di 8000 campioni annui.

La lettura è eseguita da un sofisticato sistema ottico o detector che è situato sotto la struttura delle posizioni, comprende quindi 16 sistemi di rilevazione che muovendosi da sinistra a destra e dall'esterno verso l'interno leggono la fluorescenza che il sensore sul fondo del flacone emette se vi è una riduzione di ossigeno: il sensore è incorporato nel flacone e protetto da matrice solida, è un composto fluorescente che risulta sensibile e viene inibito dall'ossigeno presente nel mezzo, quindi quando sono presenti dei micobatteri il loro metabolismo determina una riduzione della tensione di ossigeno che sblocca il sensore dall'effetto inibente dell'ossigeno e il sensore emette fluorescenza che viene rilevata dal sistema ottico.

Il vantaggio di questa tecnologia, oltre alla quantità di campioni analizzati, è la maggiore sensibilità nel rilevare micobatteri rispetto alle tecnologie che sfruttano la produzione di CO<sub>2</sub> (i micobatteri sono scarsi produttori di CO<sub>2</sub>).

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.



Figura 20: Terreno liquido MGIT da incubare nello strumento BACTEC MGIT 960



Figura 21: Strumento BACTEC MGIT 960

## 2.5 RILEVAMENTO E IDENTIFICAZIONE

### 2.5.1 PCR mediante GeneXpert MTB/RIF Ultra

Il sistema di strumentazione GeneXpert, illustrato nella Figura 22 è impiegato per eseguire il saggio Xpert MTB/RIF Ultra.

Questo saggio, basato su PCR in tempo reale, consente il rilevamento semiquantitativo del DNA del complesso *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTB). È progettato per essere eseguito su campioni di espettorato, includendo opzioni come 1 ml di espettorato non trattato o 0,5 ml di espettorato sedimentato o trattato (concentrati e decontaminati mediante il metodo NaOH-NALC e preparati da espettorato indotto o spontaneo).

Il saggio Xpert MTB/RIF Ultra è in grado di identificare *il M. tuberculosis complex* nei campioni, e in caso di rilevamento, esegue la verifica della presenza di mutazioni nel gene *rpoB*. Tali mutazioni sono associate alla resistenza alla rifampicina (RIF), un farmaco di prima linea utilizzato nel trattamento della tubercolosi.

Questo saggio è raccomandato per l'analisi di campioni provenienti da pazienti con sospetto clinico di tubercolosi, che non sono stati esposti a terapie anti-TB negli ultimi 6 mesi.

Viene utilizzato come ausilio diagnostico per la tubercolosi polmonare, affiancato da altri risultati clinici e di laboratorio.

I sistemi GeneXpert comprendono uno strumento, un computer, un lettore codici a barre e un software per l'elaborazione dei risultati. È essenziale l'utilizzo di specifiche cartucce GeneXpert monouso (Figura 23), che contengono i reagenti necessari per la PCR.

Queste cartucce sono sigillate, riducendo al minimo il rischio di contaminazione crociata.

I sistemi GeneXpert consentono l'automatizzazione del trattamento dei campioni, dell'amplificazione degli acidi nucleici e del rilevamento delle sequenze bersaglio, sfruttando la PCR e il rilevamento dei picchi di fusione.



Figura 22: strumentazione GeneXpert



Figura 23: cartuccia da inserire nello strumento GeneXpert

Il saggio Xpert MTB/RIF utilizza primer che amplificano una parte del gene *rpoB*, contenente la regione core di 81 coppie di basi, e dei tratti degli elementi di inserzione IS1081 e IS6110: l'analisi di fusione eseguita da 4 sonde per il gene *rpoB* (*rpoB1*, *rpoB2*, *rpoB3* e *rpoB4*) permette di distinguere la sequenza wild-type conservata e le mutazioni associate alla resistenza alla rifampicina mentre le due sonde per gli IS migliorano il rilevamento del *M. tuberculosis complex*.

Gli esiti del test possono essere molteplici: quando appare “MTB rilevato” è certamente presente il bersaglio MTB e questo viene quantificato come “molto basso-basso-medio-alto”, mentre la resistenza alla rifampicina può essere “rilevata” se è presente una mutazione del gene *rpoB*, “non rilevata” se non è presente nessuna mutazione di *rpoB*, oppure “incerta” quando non si può determinare a causa di picchi di fusione non validi. (Manuale istruzioni GeneXpert)

Il sistema GeneXpert MTB/RIF è un esempio che consente di individuare la presenza di *Mycobacterium tuberculosis* e di verificare la resistenza alla rifampicina in soli 100 minuti. La sensibilità di questo metodo è elevata, superando il 95% quando l'esame microscopico dell'espettorato è positivo, ma varia tra il 65% e il 77% quando l'esame è negativo. La specificità di questo test è compresa tra il 97% e il 100%.

Tuttavia, un risultato negativo non può escludere completamente la diagnosi di tubercolosi. (Cepheid international., 2023)

## 2.5.2 IDENTIFICAZIONE MEDIANTE LPA

Il test INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 rappresenta un'importante tecnologia basata su sonda a DNA per l'identificazione di micobatteri.

Questo test è progettato per l'uso in vitro e mira a identificare il genere *Mycobacterium* e 16 diverse specie di micobatteri da colture liquide o solide.

Il principio fondamentale su cui si basa è l'ibridazione inversa, che consente di sfruttare le differenze nucleotidiche nella regione spaziatrice tra rRNA 16S e rRNA 23S.

Il processo inizia con l'estrazione e l'amplificazione del DNA del campione mediante PCR, focalizzata sulla regione spaziatrice tra 16S e 23S del rRNA.

Successivamente, i prodotti di amplificazione vengono sottoposti a ibridazione con una striscia di tipizzazione contenente 22 sonde disposte in linee parallele, oltre a due linee di controllo.

Queste sonde sono progettate per legarsi specificamente a sequenze di DNA rappresentative di diverse specie di micobatteri.

Dopo l'ibridazione, si procede a un lavaggio stringente per rimuovere il materiale non specifico.

Successivamente, si osserva lo sviluppo del colore sulla striscia di tipizzazione, e il pattern di segnale risultante può essere interpretato per determinare la presenza di specifici micobatteri nel campione.

Questo approccio offre un metodo affidabile e specifico per l'identificazione di micobatteri, consentendo una diagnosi più precisa delle infezioni.

L'interpretazione del pattern di segnale sulla striscia di tipizzazione fornisce informazioni dettagliate sul tipo di micobatterio presente nel campione, contribuendo così a una gestione più mirata delle infezioni da micobatteri.

La Figura 25, mostra la struttura della striscia di tipizzazione con le sonde, sarà fondamentale per l'interpretazione accurata dei risultati e per comprendere la specificità del test nelle diverse situazioni cliniche.



Figura 24: Kit Inno-Lipa Mycobacteria v2

Il test INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 è un metodo completo e dettagliato per l'identificazione del genere *Mycobacterium* e di diverse specie di micobatteri. Le specie identificabili includono *M. tuberculosis complex*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. celatum*, *MAIS*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. scrofulaceum*, *M. haemophilum*, *M. chelonae complex*, *M. fortuitum complex* e *M. smegmatis*.

Il processo di identificazione si basa sul principio dell'ibridazione inversa. Sono coinvolte diverse sonde, ognuna con una specificità diversa. La sonda di genere identifica il genere *Mycobacterium*, le sonde di specie identificano specifiche specie di micobatteri, le sonde intraspecifiche differenziano tipi o gruppi all'interno di una specie.

Il metodo richiede almeno due campioni: uno contenente il DNA amplificato del campione in esame e l'altro che funge da controllo di amplificato in bianco (controllo negativo). Durante l'esecuzione del test, vengono seguiti numerosi passaggi, e sono necessarie precauzioni specifiche per garantire la sicurezza dell'operatore e l'accurata esecuzione del test.

I passaggi del metodo includono la denaturazione del campione, l'incubazione con la soluzione di ibridazione, l'aggiunta delle strip contenenti le sonde e la successiva incubazione e lavaggio stringente.

Dopo i lavaggi, si procede con l'aggiunta di substrato e la successiva lettura dei risultati. La lettura dei risultati avviene attraverso la valutazione del pattern di linee su una strip modello o di riferimento.

Linee evidenti e con colorazione terminale violacea/marrone sono considerate positive.

La Figura 25 mostra la strip modello o di riferimento, mentre la Figura 26 fornisce un elenco completo delle sonde con i loro identificativi e i taxa associati. La lettura dei risultati è quindi un processo intuitivo basato sulla presenza o assenza di linee positive sulla strip.

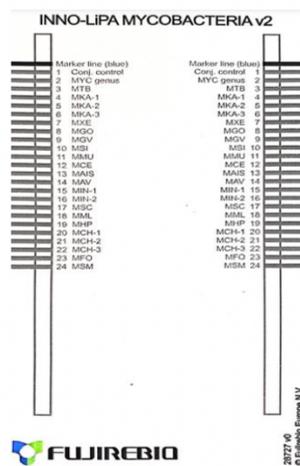


Figura 25: strip utilizzata per l'identificazione dei Micobatteri (Manuale tecnico Inno-Lipa Mycobacteria v2)

Line	Probe	Taxa reacting with the probe
2	MYC genus	Presence of <i>Mycobacterium</i> in the test sample
3	*MTB	<i>M. tuberculosis</i> complex: <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. africanum</i>
4	*MKA-1	<i>M. kansasii</i> (group I)
5	*MKA-2	<i>M. kansasii</i> (group II)
6	*MKA-3	<i>M. kansasii</i> (group III, V) <i>M. kansasii</i> (group IV), <i>M. gastri</i>
7	MXE	<i>M. xenopi</i>
8	*MGO	<i>M. goodii</i>
9	MGV	<i>M. genavense</i>
10	MSI	<i>M. simiae</i>
11	*MMU	<i>M. marinum</i> + <i>M. ulcerans</i>
12	MCE	<i>M. celatum</i>
13	*MAIS	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>MAC</i> , <i>M. malmoense</i>
14	MAV	<i>M. avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. silvaticum</i>
15	*MIN-1	<i>M. intracellulare</i> (sequevars Min-A, -B, -C and -D)
16	*MIN-2	<i>M. intracellulare</i> (sequevar Mac-A)
17	MSC	<i>M. scrofulaceum</i>
18	MML	<i>M. malmoense</i>
19	MHP	<i>M. haemophilum</i>
20	*MCH-1	<i>M. chelonae</i> complex (group I, II, III, IV, <i>M. abscessus</i> )
21	*MCH-2	<i>M. chelonae</i> complex (group III, <i>M. abscessus</i> )
22	*MCH-3	<i>M. chelonae</i> (group I)
23	*MFO	<i>M. fortuitum</i> - <i>M. peregrinum</i> complex
24	MSM	<i>M. smegmatis</i>

Figura 26: Numero e nome della sonda con i corrispondenti taxa associati (Manuale tecnico Inno-Lipa Mycobacteria v2)

### 2.5.3 TEST FENOTIPICO DI RILEVAZIONE DELLE RESISTENZE FARMACOLOGICHE DI *Mycobacterium Tuberculosis*

La diffusione delle forme di TB resistenti ai farmaci rappresenta una seria minaccia alle strategie di controllo della malattia, evidenziando l'indispensabilità dell'antibiogramma per tutti i ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) al momento del primo isolamento.

Il test di sensibilità antimicobatterica è necessario per la terapia corretta di pazienti con tubercolosi, la possibile resistenza rende la malattia ancora più difficile e costosa da curare; pertanto, la rilevazione di questi ceppi è indispensabile ai fini della somministrazione di una terapia efficace.

E' importante che i farmaci prescritti, manifestano attività specifica per *Mycobacterium Tuberculosis*, ossia che il ceppo isolato sia sensibile al farmaco.

I test fenotipici si basano sulla dimostrazione della capacità di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) di crescere su terreni, sia solidi che liquidi, contenenti farmaci antitubercolari di prima linea come etambutolo, isoniazide, streptomina e rifampicina,

L'obiettivo di tali test è stabilire la concentrazione critica, cioè la più bassa concentrazione di farmaco antitubercolare che inibisce in vitro la crescita del 99% dei ceppi wild type di Mtb. Pur essendo molto affidabili, questi test presentano l'inconveniente di richiedere tempi di esecuzione prolungati.

Il kit BACTEC MGIT 960 SIRE è un test qualitativo di 4-13 giorni, e comprende una fiala liofilizzata di streptomina, una di isoniazide, una di rifampicina ed una di etambutolo e otto fiale di supplemento SIRE.

Il test è basato sulla crescita di colonie di *Mycobacterium Tuberculosis* in due provette un contenente farmaco e l'altra senza il farmaco (controllo di crescita).

Lo strumento BACTEC MGIT 960 monitora di continuo la crescita di fluorescenza nelle provette, interpreta i risultati autonomamente usando algoritmi predefiniti che mettono a confronto la crescita nella provetta con farmaco con quella nella provetta del controllo di crescita e poi il referta il risultato di sensibilità o di resistenza.

(Kit BACTEC MGIT 960 SIRE 88-2041-1, Nuovo 05-99)

## 2.6 NGS: tecnica di sequenziamento genico applicata ai micobatteri

La rapida evoluzione della genetica negli ultimi anni ha visto l'introduzione e lo sviluppo accelerato di nuovi sistemi per il sequenziamento del genoma, noti come sequenziatori Next Generation Sequencing (NGS).

Questi avanzati strumenti hanno rivoluzionato il campo del sequenziamento del DNA, consentendo la lettura simultanea di molteplici sequenze genetiche.

(Jefferson T et al., 2017)

Di seguito è rappresentata la flow-chart della diagnosi micobatterologica nel Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'AOUAL, la tecnica di sequenziamento (Antibiogramma genotipico) e quello fenotipico partono in contemporanea nel momento in cui la PCR risulta positiva.

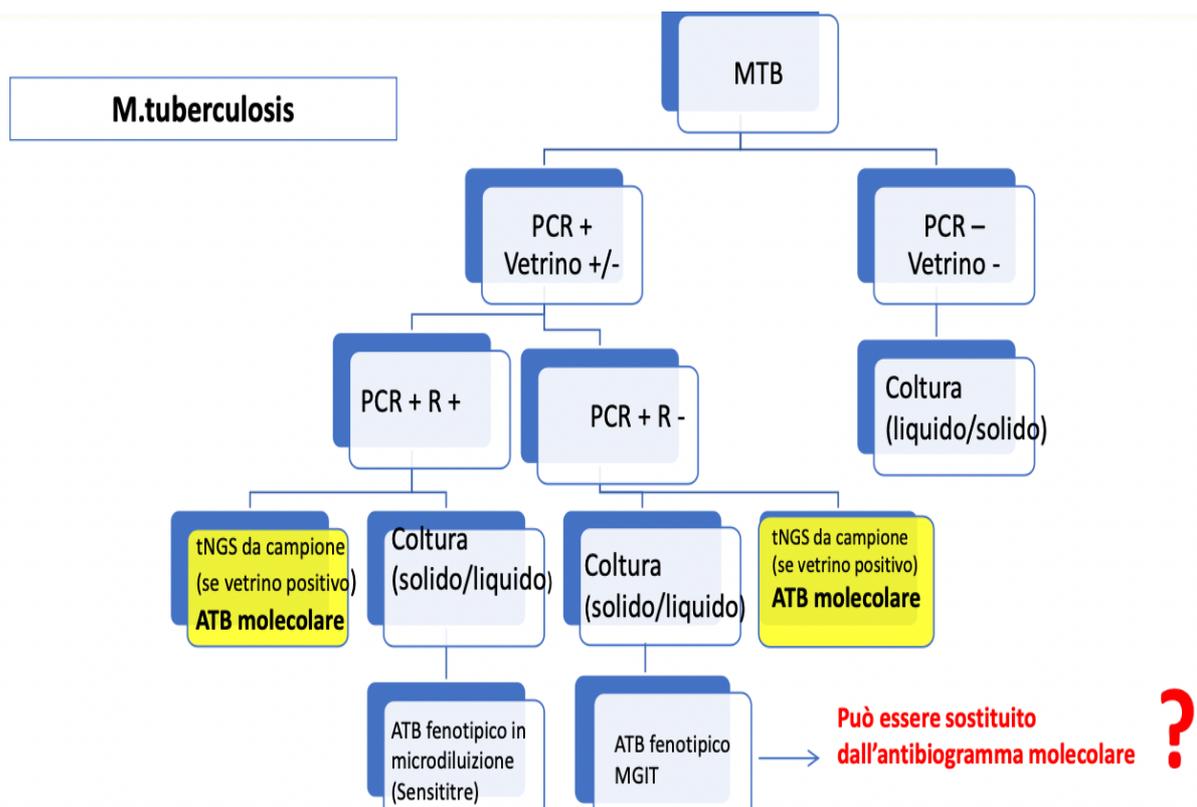


Figura 27: flow-chart della diagnosi micobatterologica

Le piattaforme di sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) disponibili sul mercato seguono generalmente un workflow comune, sebbene ci possano essere alcune variazioni a seconda del modello specifico e delle applicazioni supportate:

1. **L'inattivazione dei micobatteri** viene eseguito nella stanza BSL 3. **L'estrazione** del genoma su strumentazione QIA-cube.
2. Prima PCR : **Amplificazione** e successiva purificazione con biglie di silice e lavaggi in etanolo in tre passaggi e risospensione in acqua ( manuale).
3. **Quantificazione** dell'amplificato con fluorimetro. ( ng/ $\mu$ l)
4. Tutti i campioni devono essere normalizzati affinché la quantità di DNA abbia la stessa concentrazione ( 0,2 ng/ $\mu$ l)
5. Seconda PCR : **Tagmentazione ( TAG e FRAGMENT)** frammentazione e l'etichettatura. Frammentazione casuale con trasposasi ma lunghezza dei frammenti uniforme. La TAG è la etichettatura dei frammenti ( oligonucleotidi per una estremità e per l'altra).
6. Purificazione con biglie magnetiche
7. Terza amplificazione: **Indicizzazione** ( ogni campione avrà un indice univoco per poter essere riconosciuto ). Attaccato all'indice ci sono 2 adattatori P5 e P7 che servono per far attaccare i frammenti alla flow cell
8. Purificazione con biglie magnetiche
9. **Preparazione della library** : Quantificazione dell'amplificato con normalizzazione dei campioni attraverso diluizioni seriali ( diluizione dei campioni in funzione del campione più povero di DNA. Tutti devono essere portati alla concentrazione di 1 nanomoli. Successivamente altra diluizione per portare i campioni a concentrazione di 60 picomoli.

- **Tempo operatore tecnico: 8-10 h**
- **Tempo analisi del software: circa 3 h**
- **Tempo di interpretazione e refertazione: 3 h circa (1 seduta)**

*Figura 28: workflow del processo di sequenziamento NGS*

Nel workflow precedentemente descritto, è importante notare che l'estrazione del DNA viene eseguita con precisione mediante l'utilizzo dello strumento Qia-Cube (Figura A) subito dopo l'inattivazione dei micobatteri.

Nelle successive fasi di PCR il materiale genetico viene amplificato per essere preparato al sequenziamento.

La determinazione della sequenza del DNA è poi condotta tramite il sistema Illumina iSeq 100 (figura B) che integra in un unico strumento le fasi di denaturazione delle librerie, l'amplificazione clonale, il sequenziamento e l'analisi dei dati, eliminando così la necessità di acquistare apparecchiature accessorie. (Manuale Sistema iSeq Illumina 100., 2020)



A) Strumentazione Qia-Cube



B) Strumentazione iSeq 100 Illumina

Il Deeplex®-Myc-TB è un test molecolare in vitro di Next Generation Sequencing (NGS) basato sulla amplificazione mediante PCR e successivo sequenziamento in NGS di campioni clinici di pazienti con sospetta infezione da *M. tuberculosis complex* MTBC, ed il test consente di identificare il MTBC e altre 140 specie di micobatteri, tra cui anche micobatteri non tubercolari, e di rilevare la presenza di resistenze a 15 farmaci antitubercolari di prima e seconda linea, il tutto con analisi della durata da 24h a 48h.



Figura 29: kit Deeplex Myc-TB

Il test inizia con la estrazione del DNA dal campione clinico sospetto e su questo viene svolta una PCR multiplex per amplificare le regioni genomiche di 18 geni MTBC associati a resistenza ai farmaci, del gene *hsp65* e del locus DR/CRISPR (target di spogliotipizzazione, direct repeat);

la Figura 30 riporta l'elenco delle regioni geniche amplificate ed i loro rispettivi significati, tra cui l'identificazione del micobatterio, la resistenza ad antibiotici di prima linea (rifampicina, etambutolo..) e di seconda linea e la resistenza a nuovi antibiotici.

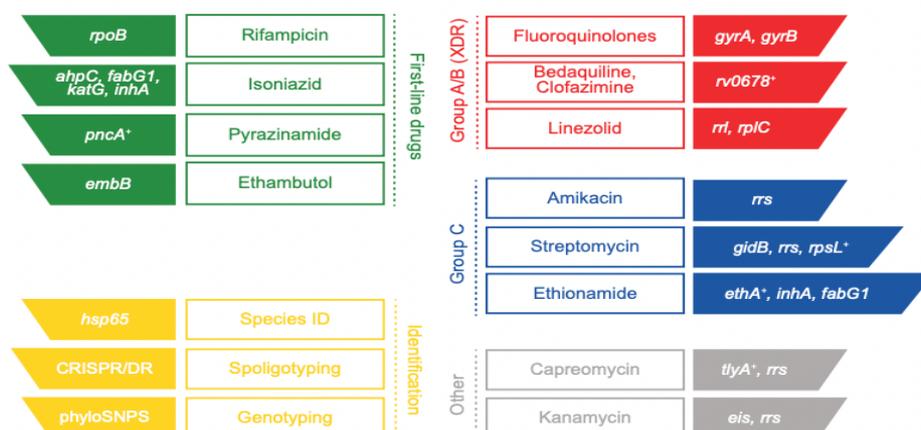


Figura 30: Regioni geniche amplificate e sequenziate con il test Deeplex Myc-TB

L'identificazione del ceppo di MTBC avviene con il sequenziamento del gene *hsp65*: l'identità nucleotidica del gene *hsp65* è in grado di identificare altri 140 micobatteri oltre al MTBC, come il *M. kansasii*, *M. abscessus*, il *M. intracellulare* o il *M. avium complex*, e di determinare co- infezioni, mentre il locus DR/CRISPR ed i polimorfismi a singolo nucleotide permettono la spoligotipizzazione e genotipizzazione. L'identificazione di mutazioni nelle regioni geniche MTBC associate alla resistenza ai farmaci invece possono indicare una resistenza o suscettibilità al farmaco in questione, e per la loro interpretazione queste mutazioni vengono confrontate con le varianti note incluse in un database di riferimento.

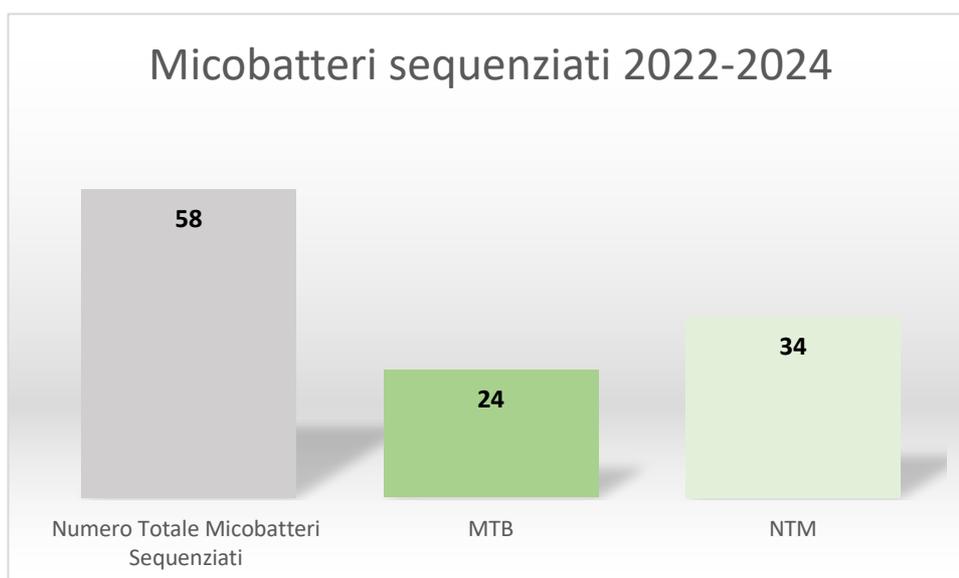
Il test ha una alta sensibilità, e una specificità del 97% rispetto ai test fenotipici.

### 3 RISULTATI

La valutazione preliminare della Next-Generation Sequencing mirata (tNGS) per l'identificazione di *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) e micobatteri non tubercolari (NTM) nella routine del laboratorio clinico indica l'intenzione di esaminare l'applicabilità e l'efficacia di questa tecnologia nel contesto diagnostico.

In questo paragrafo vengono riportati i risultati relativi al numero di test eseguiti ed ai loro esiti dal 2022 ad oggi presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria.

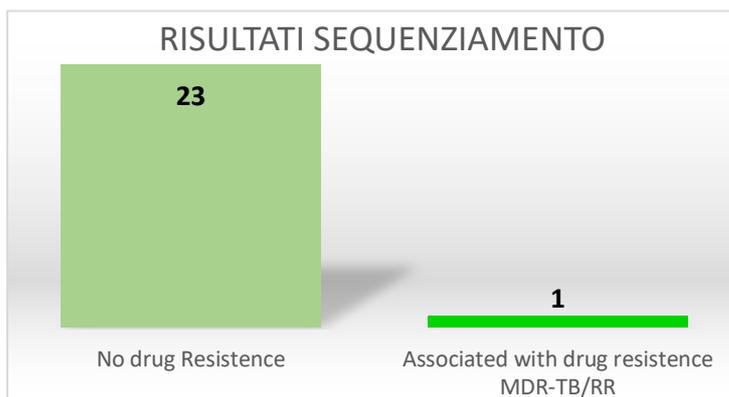
Come si può notare dal Grafico sottostante, dal 2022 fino ad ora, in totale sono stati sequenziati 58 campioni di cui 24 MTB e 34 NTM.



### 3.1 Tubercolari (MTB)

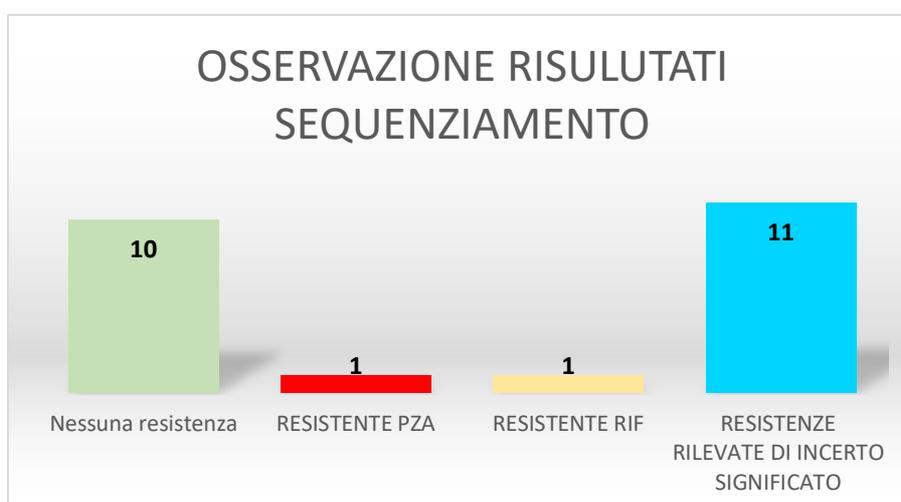
Per quanto riguarda lo studio delle resistenze ai farmaci antitubercolari si sono considerati i pazienti con esame colturale, vetrino e PCR positiva.

Dall'analisi delle resistenze ai farmaci antitubercolari attraverso la Targeted Next-Generation Sequencing (tNGS) su 24 campioni di *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) che sono stati sequenziati, è emerso che soltanto 1 campione è stato associato a una forma di tubercolosi multidrug-resistant (MDR-TB) o rifampicin-resistant (RR).



È importante sottolineare che sul totale dei campioni No drug resistance abbiamo osservato che:

- in 10 campioni non è stata rilevata alcuna resistenza
- in 1 campione è stata rilevata una resistenza al farmaco PZA
- in 1 campione è stata rilevata una resistenza al farmaco RIF
- e in 11 sono state rilevate resistenze di incerto significato.



- ❖ Il grafico sottostante si concentra sui 10 campioni in cui non è stata rilevata alcuna resistenza ai farmaci.



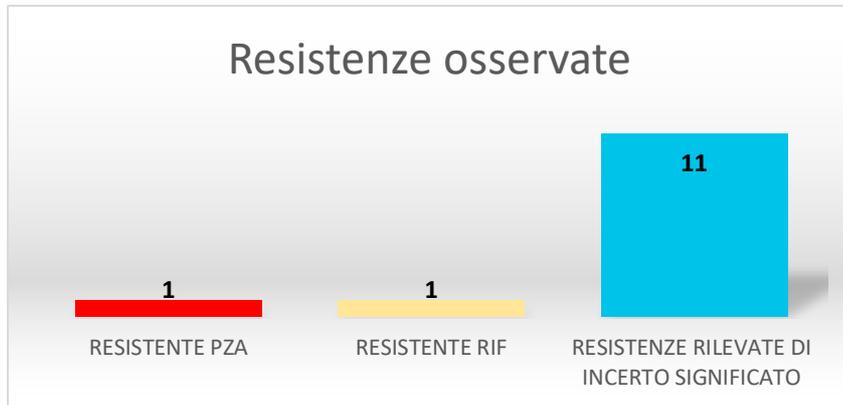
Nel contesto dell'AOUAL, i risultati del sequenziamento tNGS vengono presentati e visualizzati attraverso l'app web Deeplex®. Questi risultati si manifestano con un andamento simile tra tutti, evidenziando chiaramente specificità individuali.

Di seguito viene fornito un esempio di grafico rappresentativo:





- ❖ Il risultato dei campioni in cui si è osservata una resistenza è il seguente:
  - 1 campione resistente al PZA
  - 1 campione Resistente alla RIF
  - 11 campioni in cui sono state rilevate resistenze di incerto significato



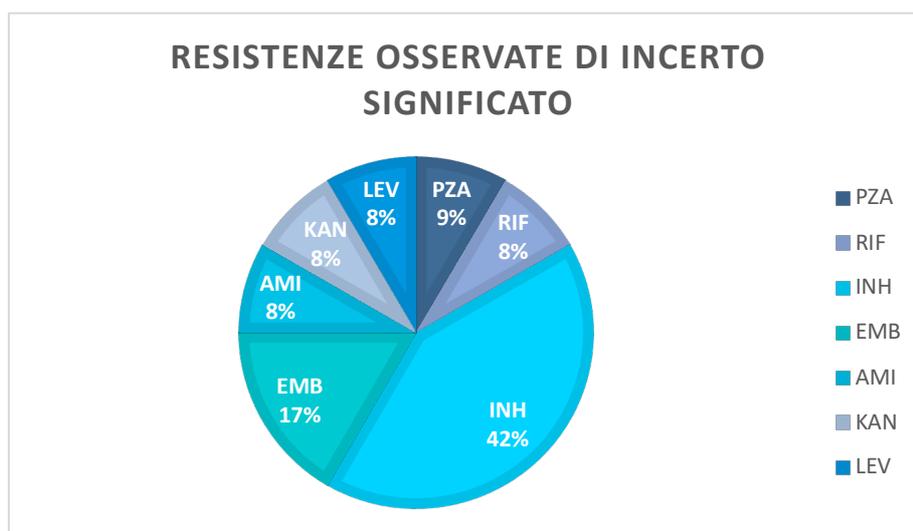
Nel caso in cui si identifichi un ceppo con una mutazione associata alla resistenza, il risultato dell'grafico successivo (antibiogramma molecolare) evidenzia tale mutazione mediante il colore rosso.

Ogni risultato, in basso, riporta il gene con il codone di riferimento e l'AA mutato.



Le resistenze di significato incerto, individuate in 11 campioni, sono visualizzate nel grafico successivo, evidenziando i seguenti dati:

- Nel 42% dei campioni è stata rilevata nel farmaco INH
- Nel 17% dei campioni è stata rilevata nel farmaco EMB
- Nel 9% dei campioni è stata rilevata nel farmaco PZA
- Nell'8% dei campioni è stata rilevata nei farmaci: RIF -LEV- AMI-KAN



Nell'immagine sottostante è riportato il risultato del sequenziamento genetico, offrendo una dettagliata visualizzazione delle variazioni e mutazioni correlate alle posizioni specifiche del genoma.

Questa rappresentazione grafica fornisce una chiara illustrazione delle variazioni genetiche, mettendo in evidenza specifiche mutazioni nel materiale genetico che possono portare a una modifica della tripletta amminoacidica, senza tuttavia alterare l'aminoacido.

Alternativamente, potrebbe essere presente incertezza anche nel caso in cui avvenga una modifica dell'aminoacido.



- ❖ L'Antibiogramma Fenotipico dell'unico caso di TB che presentava MDR/RR ha avuto il seguente esito:
  - Resistente al farmaco Rifampicina
  - Resistente alle diverse concentrazioni del farmaco Isoniazide
  - Resistente al farmaco Pirazinamide
  - Resistente alla concentrazione 1.0 del farmaco Streptomina

#### Ricerca micobatteri

Lavaggio Broncoalveolare  
Esame microscopico Positivo ++

#### Ricerca micobatteri

Ric. molecolare Mycobacterium tuberculosis complex POSITIVA. Rilevati geni di resistenza alla Rifampicina

#### Ricerca micobatteri

Isolato: - 1- Mycobacterium tuberculosis complex

	RSI	MIC
Etambutolo 5.0	S	
Etambutolo 7.5	S	
Isoniazide 0.1	R	
Isoniazide 0.4	R	
Pirazinamide	R	
Rifampicina 1.0	R	
Streptomina 1.0	R	
Streptomina 4.0	S	

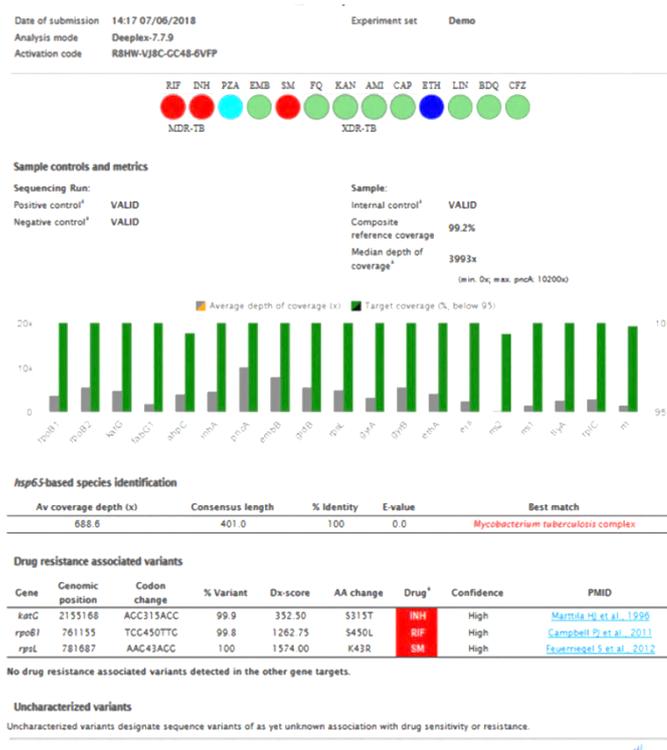
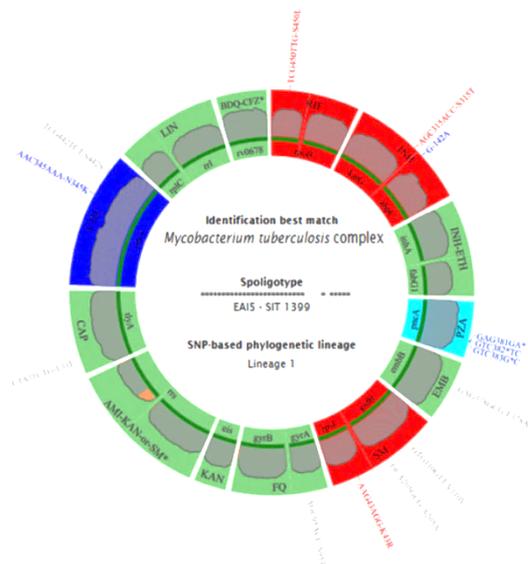
tutti i valori espressi in mg/l

In questo contesto, il termine MDR (Multidrug-Resistant) è utilizzato per indicare che il ceppo è resistente a rifampicina e isoniazide, due antibiotici fondamentali per il trattamento della tubercolosi.

Il risultato è stato confermato poi confermato dall'antibiogramma genotipico.

La colorazione in rosso indica chiaramente la presenza di mutazioni associate a questa resistenza, offrendo una rappresentazione visiva immediata del profilo di resistenza antibiotica del ceppo analizzato.

Le mutazioni di incerto significato sono rappresentate in blu nel grafico, evidenziando alterazioni genetiche che potrebbero avere un impatto incerto sulla sensibilità antibiotica. Queste mutazioni potrebbero non essere chiaramente identificabili attraverso l'antibiogramma fenotipico tradizionale.



Il singolo risultato ottenuto per TB-MDR è completamente coerente con i dati epidemiologici della nostra regione, come riportato dal Servizio di Riferimento Regionale di Epidemiologia (Seremi) dell'ASL AL. Questa congruenza sottolinea la validità e la rilevanza del nostro sequenziamento in relazione alla situazione epidemiologica locale. La precisione del nostro risultato contribuisce alla comprensione accurata della resistenza multipla ai farmaci nella nostra area, fornendo una base solida per le decisioni diagnostiche e terapeutiche. (Seremi report ASL-AL., 2018)

- Il **REFERTO** dell'AOU AL integra un'analisi dettagliata del ceppo microbico:
- ◆ Nella prima pagina viene fornita una descrizione del ceppo analizzato, evidenziando il Lignaggio, Spoligotipo, Profondità della Coverage ed un eventuale commento.
- ◆ Nelle pagine due e tre del referto, vengono riportati i risultati principali, e se sono emerse mutazioni significative.

Nella colonna di sinistra del referto, vengono indicati i farmaci, nella colonna adiacente vengono specificate le regioni geniche coperte dal sequenziamento, e nell'ultima colonna verso destra viene presentato il dettaglio delle mutazioni rilevate.

Insieme, queste informazioni offrono un quadro completo e dettagliato della sensibilità del ceppo rispetto ai farmaci, consentendo agli operatori sanitari di prendere decisioni informate sulla terapia da adottare.

	<b>AOAL</b>	Azienda Ospedaliera di ALESSANDRIA Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo	S.C. MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA Direttore: Dr. Andrea Rocchetti
Certificato UNI EN ISO 9001:2015			
REFERTO EMESSO IL 31-10-2023 ALLE ORE 17:24:15 IN CORREZIONE AL PRECEDENTE			
Provenienza: <b>Reparto di Prova</b>		<b>PAPERINO UNO</b>	
Nr. Richiesta <b>1600599478</b>		02-02-1999	M
Id Inviante			
del <b>26-07-2023 11:14</b>		<b>APOLIDE</b>	
C. FIS: PPRNUO99B02Z999Y			
<i>Esame Richiesto</i>	<i>Risultato</i>	<i>U.M.</i>	<i>Valori di Riferimento</i>
<p><b>Identificazione Micobatteri - Test di Sequenziamento</b></p> <p>Ceppo da coltura</p> <p><b>Esito ricerca</b>                      POSITIVO</p> <p><b>Microorganismo isolato:</b>              Mycobacterium tuberculosis complex</p> <p><b>Lignaggio</b>                                      4</p> <p><b>Spoligotipo</b>                                    LAM9 - SIT42</p> <p><b>Profondità mediana di Coverage</b>              4000x</p> <p><b>Commento</b>                                      Ceppo MDR: rilevata resistenza per Pirazinamide e Rifampicina</p> <p style="text-align: center; font-size: x-small;">Eventuale commento disponibile</p>			

Provenienza: **Reparto di Prova**
**PAPERINO UNO**

 Nr. Richiesta **1600599478**
**02-02-1999**
**M**

Id Inviante

 del **26-07-2023 11:14**

PPRNUO99B02Z999Y

**APOLIDE**

Esame Richiesto

Risultato

U.M.

Valori di Riferimento

**Antibiogramma genotipico MTB Complex**

Identificazione specie		Mycobacterium tuberculosis	
Farmaco	Gene (posizioni)	Risultato	
<b>Streptomicina</b>	gidB (18:+117) rpsL (-24:+45)* rrs1 (716:1572) rrs2 (3:679)	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Isoniazide</b>	inhA (86:679) fabG1 (-119:316) katG (254:972) ahpC (-163:393)	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Rifampicina</b>	rpoB1 (1151:1549) rpoB2 (147:1006)	Resistente	Mutazione associata a farmacoresistenza. AGT652TGT
<b>Etambutolo</b>	embB (863:1552)	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Pirazinamide</b>	pncA (-60:+9)*	Resistente	Mutazione associata a farmacoresistenza. GGT458ATG (U56G)
<b>Ofloxacina/Levofloxacina/ moxifloxacina</b>	gyrA (76:453) gyrB (1059:1704)	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Amikacina</b>	rrs1 (716:1572) rrs2 (3:679)	Evidenze insufficienti	Mutazione dal significato non ancora definito. AGT584TGA (T45A)
<b>Capreomicina</b>	rrs1 (716:1572) rrs2 (3:679) tlyA (-129:+4)*	Sensibile	Nessuna mutazione. -



Azienda Ospedaliera  
di **ALESSANDRIA**  
Santi Antonio e Biagio  
e Cesare Arrigo

Regione Piemonte

S.C. MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA  
Direttore: Dr. Andrea Rocchetti

Certificato UNI EN ISO 9001:2015

Provenienza: **Reparto di Prova**

**PAPERINO UNO**

Nr Richiesta **1600599478**

**02-02-1999**

**M**

Id Inviante

del **26-07-2023** **11:14**

PPRNUO99B02Z999Y

**APOLIDE**

Esame Richiesto

Risultato

U.M.

Valori di Riferimento

<b>Kanamicina</b>	rrs1 (716:1572) rrs2 (3:679) eis (-196:162)	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Etionamide</b>	inhA (86:679) fabG1 (-119:316) ethA (-9:+53)*	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Bedaquilina</b>	rv0678 (-14:+52)*	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Clofazimina</b>	rv0678 (-14:+52)*	Sensibile	Nessuna mutazione. -
<b>Linezolid</b>	rrl (2266:2968) rplC (300:21)	Sensibile	Nessuna mutazione. -

\* copertura dell'intero gene

Rilevata mutazione di incerto significato sul gene gyrB (CTG479CTT)

Referto firmato Digitalmente  
dal Dott. PAOLO BOTTINO il 31-10-2023 alle 17:58:00

### 3.2 Non Tubercolari (NTM)

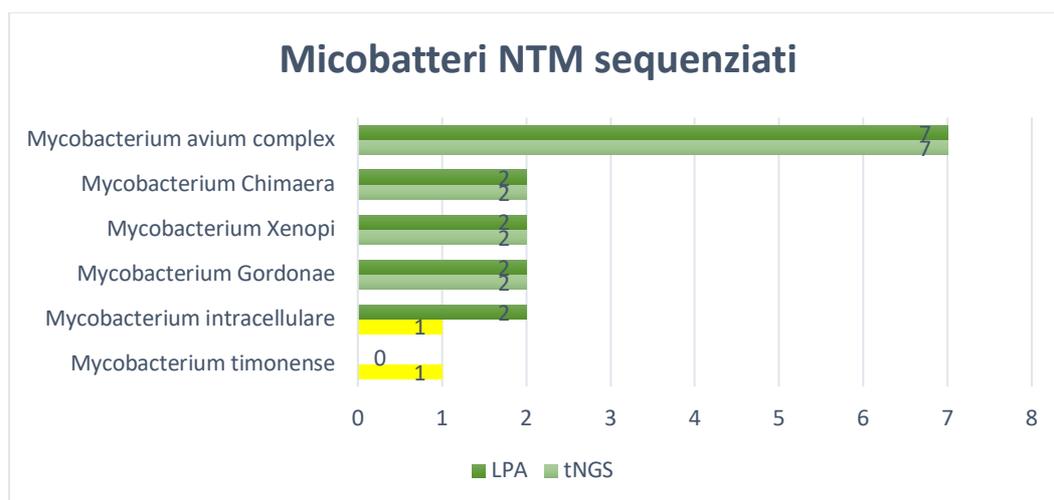
Tra i 34 casi di micobatteri non tubercolari (NTM) sottoposti a test mediante il sequenziamento di nuova generazione target (tNGS) per scopi di validazione interna, ne sono stati scelti 15 per confrontarne i risultati con quelli ottenuti attraverso il test LPA (Line Probe Assay).

L'accordo complessivo tra i dati NGS e il saggio di ibridazione inversa per i micobatteri non tubercolari (NTM) è stato del 92,3% (12/13). Ciò indica che su 13 campioni di NTM, 12 sono stati identificati correttamente da entrambi i metodi.

Il *Mycobacterium avium complex* (*M.avium*, *M.paratuberculosis*, *M.silvaticum*) è stato il gruppo più rappresentato la cui identificazione è stata concordante per tutti e 7 i campion

Un'unica discrepanza è stata osservata in un ceppo di NTM che è stato identificato:

- come *Mycobacterium intracellulare* con il saggio di ibridazione inversa (LPA)
- *Mycobacterium timonense* con il metodo NGS mirato (tNGS).



ID Simple	Targeted-NGS	Inno-Lipa
1	Mycobacterium avium complex	Mycobacterium avium complex
2	Mycobacterium avium complex	Mycobacterium avium complex
3	Mycobacterium avium complex	Mycobacterium avium complex
4	Mycobacterium avium complex	Mycobacterium avium complex
5	Mycobacterium avium complex	Mycobacterium avium complex
6	Mycobacterium avium complex	Mycobacterium avium complex
7	Mycobacterium avium complex	Mycobacterium avium complex
8	Mycobacterium chimaera	Mycobacterium chimaera
9	Mycobacterium chimaera	Mycobacterium chimaera
10	Mycobacterium xenopi	Mycobacterium xenopi
11	Mycobacterium xenopi	Mycobacterium xenopi
12	Mycobacterium gordonae	Mycobacterium gordonae
13	Mycobacterium gordonae	Mycobacterium gordonae
14	Mycobacterium intracellulare	Mycobacterium intracellulare
15	Mycobacterium timonense	Mycobacterium intracellulare



## 4 DISCUSSIONE

### ✧ Tubercolari (MTB)

Uno degli obiettivi del nostro studio è stato quello di valutare le informazioni aggiuntive fornite dalla Targeted Next-Generation Sequencing (tNGS) rispetto all'antibiogramma fenotipico dei *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

Le analisi che ricaviamo dal tNGS ci forniscono una serie di informazioni dettagliate che vanno oltre le capacità dell'antibiogramma fenotipico, e comprendono:

- ❖ L'Identificazione dei micobatteri: La tNGS permette un'identificazione precisa dei micobatteri presenti nei campioni, in quanto viene presa in considerazione la sequenza hsp65.
- ❖ Lignaggio: grazie al rilevamento dei polimorfismi a singolo nucleotide, ci da un'idea del tipo di ceppo in esame.
- ❖ Spoligotipo: ci da un'idea più approfondita del ceppo.

Lo spoligotipo, una tecnica molecolare impiegata per esaminare il polimorfismo nel locus DR nei batteri del genere *Mycobacterium* che contiene da 9 a 50 copie identiche di una sequenza di 36 paia di basi, denominata Direct Repeat (DR), intervallate da sequenze spaziatrici (spacer) di lunghezza variabile tra 35 e 41 paia di basi. Tuttavia, va notato che lo spoligotyping potrebbe non essere sempre sufficientemente discriminativo per distinguere ceppi molto simili, poiché il numero limitato di spacer e sequenze spaziatrici può portare a spoligotipi simili o identici tra ceppi diversi. Pertanto, quando è richiesta una maggiore discriminazione, possono essere adottate tecniche più avanzate come il sequenziamento del genoma completo.

Va sottolineato che, pur offrendo un'idea approfondita del ceppo, lo spoligotyping potrebbe presentare limiti nello stabilire correlazioni epidemiologiche dettagliate tra ceppi simili.

(Amcli Percorso diagnostico per la tubercolosi e le micobatteriosi., 2018)

- ❖ Antibiogramma: Questo test è progettato per prevedere simultaneamente la (etero)resistenza a 15 farmaci o classi di farmaci antitubercolari, effettuare la genotipizzazione di *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC). Rileva:
  - le mutazioni presenti sui geni target
  - le doppie mutazioni sono rilevate con la doppia percentuale in base alla loro espressione
  - ed inoltre, è in grado di discriminare potenziali infezioni miste o co-infezioni MTB e NTM
  
- ❖ Un ulteriore vantaggio è dato dall'Interpretazione dei risultati che risulta essere facilitata dal software in quanto le sequenze "reads" ottenute vengono confrontate con le sequenze di riferimento del catalogo del WHO.
  
- ❖ La riduzione del tempo in caso si possa partire da un campione sufficientemente bacillifero, rispetto all'antibiogramma fenotipico che risulta legato alla crescita del microorganismo, rappresenta un elevato vantaggio per l'impostazione terapeutica.

Tuttavia, va evidenziato che possono verificarsi delle criticità:

- ◆ Essendo un targeted sequencing (tNGS) fornisce informazioni solo su una parte limitata del genoma, quindi, non può essere fatto nessuno studio epidemiologico, se non utilizzando il metodo di sequenziamento dell'intero genoma (WGS).

*"L'approccio WGS consente un approccio "tutto in uno" fornendo risultati sulla sensibilità prevista dei ceppi, background genetico, dati epidemiologici e indicazione del rischio di contaminazione incrociata di laboratorio".*

(Daniela M. Cirillo et al., 2016)

Quindi il metodo WGS per la rilevazione delle mutazioni offre nuove opportunità per studiare le mutazioni di resistenza, ma anche per esaminare il genotipo del ceppo che può controllare la diffusione epidemica.

(Marion Beviere et al., 2023)

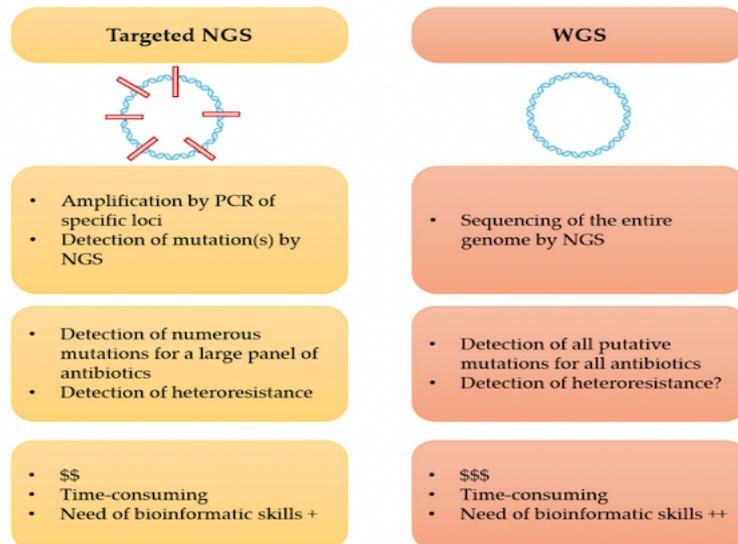


Figura 32: Vantaggi e limiti delle tecniche molecolari per la rilevazione di mutazioni di resistenza in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

- ◆ Le mutazioni emerse negli ultimi anni possono non essere contenute nel catalogo WHO, e dato che il sistema compara i dati questo potrebbe rappresentare un gran problema.
- ◆ Un'ulteriore criticità si riscontra nei costi associati e nell'ottimizzazione della cartuccia.
- ◆ La gestione del tempo, in particolare il tempo uomo, costituisce un'altra criticità. Tuttavia, questa sfida potrebbe essere affrontata con successo attraverso l'introduzione di un preparatore di librerie automatizzato, che consente di ottimizzare la fase di preparazione delle librerie. Quest'ultima, essendo sia delicata che temporalmente impegnativa, beneficerebbe notevolmente dall'automazione, consentendo una maggiore efficienza complessiva del processo
- ◆ mancanza di controlli di qualità esterni per verificare l'intero processo

◆ Discordanze Fenotipo/Genotipo

La convinzione tradizionale che l'antibiogramma fenotipico rappresenti il gold standard è stata recentemente messa in discussione, specialmente quando sono emerse mutazioni nell'hot-spot del gene rpoB associate a esiti sfavorevoli della terapia con rifampicina, nonostante la sensibilità apparente al farmaco nel metodo MGIT.

In presenza di tale discordanza fenotipo/genotipo, la sensibilità al MGIT non può più essere considerata il gold standard e potrebbe necessitare di ulteriori verifiche attraverso il sequenziamento dell'hot-spot del gene rpoB. Nel caso specifico del test GenoType MTBDRplus v.2, alcune mutazioni, identificate dalle sonde WT2, WT3+WT4, WT5+WT6, WT8 e dalla sonda WT7 (quest'ultima sia singolarmente che in combinazione con MUT1 o MUT2 Tabella 5), sono associate a una falsa resistenza al MGIT (confermato dalle analisi fenotipiche).

Questo sottolinea l'importanza di valutare attentamente la concordanza tra fenotipo e genotipo per una diagnosi accurata della resistenza antibiotica.

*(Amcli Percorso diagnostico per la tubercolosi e le micobatteriosi., 2018)*

Sonde GenoType		mutazione
wild tipe	mutata	
WT2	nessuna	L511P
WT3/WT4	nessuna	D516Y
WT5/WT6	nessuna	S522Q
WT7	MUT2A	H526Y
	MUT2B	H526D
	nessuna	H526N H526L
WT8	nessuna	L533P

*Tabella 5: Mutazioni responsabili della resistenza alla rifampicina che possono essere associate a falsa sensibilità al farmaco in MGIT (Amcli., rev 2018).*

## ✘ **Non Tubercolari (NTM)**

I risultati ottenuti hanno chiaramente evidenziato che la Next-Generation Sequencing (NGS) mirata potrebbe costituire un potente strumento per l'identificazione precisa dei micobatteri non tubercolari (NTM). Questo approccio presenta diversi vantaggi:

### ➤ **Buona capacità di identificazione con il supporto del catalogo WHO:**

La NGS mirata dimostra una buona capacità di identificazione, avvalendosi del catalogo dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) come riferimento. Fornisce una valutazione accurata e dettagliata delle sequenze genetiche, consentendo una discriminazione affidabile tra le diverse specie di micobatteri. Questi risultati indicano chiaramente il notevole potenziale di questo approccio nella diagnosi microbiologica.

### ➤ **Potere discriminatorio elevato rispetto al Line Probe Assay (LPA)**

nei complessi e identificazione di specie rare: In confronto con il LPA, la NGS ha dimostrato di possedere un potere discriminatorio superiore all'interno dei complessi di micobatteri e una maggiore capacità di identificazione di specie rare. Inoltre, la tNGS offre la possibilità di individuare eventuali coinfezioni e di esplorare l'intero profilo genetico, inclusi eventuali mutazioni, fornendo una visione più completa. Al contrario, il test LPA è in grado di rilevare solo alcune mutazioni più comuni, limitando la sua capacità di analisi dettagliate del profilo genetico.

### ➤ **Un ulteriore vantaggio è quello temporale**, in quanto mentre l'inno-lipa richiede il ceppo cresciuto in coltura, il kit NGS può essere eseguito su campione diretto se bacillifero.

Tuttavia, è importante notare alcuni limiti del metodo NGS:

### ➤ **Incapacità di rilevare farmaco-resistenze nei NTM:** Attualmente, il metodo applicato ai NTM non è in grado di rilevare le resistenze ai farmaci in quanto non esistono database dettagliati che possano identificare i geni associati a tali resistenze.

### ➤ **costi differenti rispetto al Line Probe Assay (LPA):** Se confrontato con il LPA, la NGS comporta costi maggiori (circa 300 euro), rispetto a (circa 60 euro) del LPA.

## 5 CONCLUSIONI

In conclusione, valutando come obiettivo generale del nostro studio l'introduzione in routine diagnostica del tNGS in un laboratorio clinico di medie dimensioni che processa circa 1000 campioni l'anno, abbiamo rilevato delle criticità, la maggiore è quella legata all'ottimizzazione delle sedute analitiche (cartucce) per il contenimento dei costi poco compatibile con i limitati casi di tubercolosi e la necessità di dare risposte nel più breve tempo possibile.

È importante tenere presente che l'obiettivo primario è sempre quello di realizzare un trattamento che sia efficace e tempestivo al fine di prevenire ulteriori mutazioni di resistenza ai farmaci durante il trattamento della tubercolosi.

L'utilizzo delle tecnologie NGS, come il sequenziamento di nuova generazione, ha evidenziato la capacità di ottenere informazioni dettagliate sul genoma, la variabilità genetica e la dinamica evolutiva dei micobatteri.

La possibilità di analizzare simultaneamente un gran numero di campioni e generare dati di alta qualità in tempi rapidi ha dimostrato di essere una risorsa fondamentale nella lotta contro le malattie micobatteriche.

Tuttavia, è importante sottolineare che il successo dell'approccio NGS nel contesto dei micobatteri è strettamente legato alla gestione e all'interpretazione accurata dei dati che vengono prodotti.

Le sfide legate all'analisi bioinformatica, all'integrazione di dati multidimensionali e alla standardizzazione delle metodologie richiedono attenzione continua per massimizzare il potenziale di queste tecnologie. La ricerca e lo sviluppo nel campo delle tecnologie NGS dovrebbero essere accompagnati da sforzi mirati a superare tali sfide e garantire un utilizzo efficace di queste risorse innovative nella lotta contro le malattie micobatteriche.

*Prospettive Future:* L'auspicio è la formazione di una rete regionale NGS.

La rete non solo potrebbe contribuire a contenere i costi iniziali, ma a svolgere un ruolo cruciale nella standardizzazione dei processi.

L'obiettivo primario della rete dovrebbe essere il raggiungimento della certificazione di qualità, garantendo un alto standard di precisione e affidabilità nelle attività di sequenziamento.

Nella costruzione di questa rete, attribuiamo fondamentale importanza alla formazione. Solo attraverso un approccio formativo strutturato sarà possibile progredire nella definizione delle necessità specifiche, nella scelta di strumentazioni adeguate, nell'organizzazione efficace delle attività e nella standardizzazione dei processi.

La formazione rappresenta la base su cui costruire un percorso verso la certificazione di qualità, fornendo le competenze necessarie per affrontare le sfide che possono emergere nel processo di sequenziamento.

## ***BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA***

- \* AMCLI., rev 2023. “Percorso Diagnostico Tuberculosisi”
  - [https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2024/02/2023-18\\_TUBERCOLOSI-E-ALGORITMO.pdf](https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2024/02/2023-18_TUBERCOLOSI-E-ALGORITMO.pdf)
  
- \* AMCLI., rev 2023. “Diagnosi Immunologica dell’Infezione Tuberculare”
  - [https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2023/05/19\\_PD\\_LTB\\_def25mag2023\\_completo.pdf](https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2023/05/19_PD_LTB_def25mag2023_completo.pdf)
  
- \* AMCLI., rev 2018. “Percorso diagnostico per la Tuberculosis e le micobatteriosi”
  - <https://www.amcli.it/wp-content/uploads/2018/03/Percorso-Diagnostico-della-Tuberculosis-v27feb19.pdf>
  
- \* Anca Vasiliu et al., 2023 “ Tuberculosis prevention: current strategies and future directions”
  - <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1198743X23005335>
  
- \* Anne-Laure Bañuls et al., 2015. “ Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium”
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26385049/>
  
- \* Barry R Bloom et al., 2017. “Tuberculosis”
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30212088/>
  
- \* C Lange et al., 2009. “Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: sensible or silly?”
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19483044/>
  
- \* (Centorrino Francesco., 2020. “La Tuberculosisi”
  - <https://www.microbiologiaitalia.it/patologia/tuberculosisi/>
  
- \* Centro diagnostico italiano., 2019. “La tuberculosisi”
  - <https://www.cdi.it/approfondimento/la-tuberculosisi/>

- \* Cepheid international., 2023. “Raising the standard for tuberculosis Diagnosis”
  - <https://cepheid.widen.net/content/nplalnbp0m/pdf/Cepheid-Xpert-MTB-RIF-Ultra-Brochure-CE-IVD-3098-English.pdf?u=bk12mm>
  
- \* Cirillo Daniela M et al., 2016. “ Use of WGS in Mycobacterium tuberculosis routine diagnosis
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28043590/>
  
- \* Claudia Carranza et al., 2020. “Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives”
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33013856/>
  
- \* ECDC., 2023. “European Centre for Disease Prevention and Control: Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2023-2021”.
  - <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2023-2021-data>
  
- \* ECDC., 2021 Surveillance report: Tuberculosis
  - <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/tuberculosis-annual-epidemiological-report-2021.pdf>
  
- \* Edward A.Nardell., 2022. “Tubercolosi”.
  - <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/micobatteri/tubercolosi>
  
- \* Fondazione Misi., 2016. “Fondazione Malattie Infettive e salute internazionale: Making weak TB drugs strong again 3-D structures could lead to more potent fluoroquinolones for the fight against other disease-causing bacteria too”
  - <https://www.fondazionemisi.it/news/tubercolosi/making-weak-tb-drugs-strong-again-3-d-structures-could-lead-to-more-potent-fluoroquinolones-for-the-fight-against-other-disease-causing-bacteria-too.html>
  
- \* Gabriel T Mashabela et al., 2019. “Mycobacterium Tuberculosis Metabolism”.

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31350832/>
- ✳ Isaar Smith., 2023. "Mycobacterium Tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence."
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12857778/>
- ✳ Isabelle Suarez et al., 2019. "The diagnosis and treatment of Tuberculosis".
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31755407/>
- ✳ Jean Pierre Zellweger et al., 2020. " The diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI): currently available tests, future developments, and perspectives to eliminate tuberculosis (TB)"
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32624559/>
- ✳ Jefferson T et al., 2017. "Next Generation Sequencing (NGS)"
  - [https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_ReportDispositivi\\_7\\_documentoInglese\\_inglese\\_itemName\\_0\\_documentoENG.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_ReportDispositivi_7_documentoInglese_inglese_itemName_0_documentoENG.pdf)
- ✳ Jeffrey A Tornheim et al., 2019. "The Global Landscape of Tuberculosis Therapeutics".
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30403551/>
- ✳ Ky Loh., 2011. "Role of Mantoux test in the diagnosis of tuberculosis"
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25606232/>
- ✳ Madhukar Pai et al., 2016. "Tuberculosis".
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27784885/>
- ✳ Manuale iSeq Illumina 100., 2020. "Sistema iSeq 100".
  - <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/iseq-100-sequencing-system-spec-sheet-770-2017-020-translations/iseq-100-sequencing-system-spec-sheet-770-2017-020-ita.pdf>
- ✳ Manuale tecnico per la diagnosi Microbiologica della Tuberculosis
  - [https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_publicazioni\\_614\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_publicazioni_614_allegato.pdf)

- ✳ Marion Beviere et al., 2023. “The Role of Next-Generation Sequencing (NGS) in the Management of Tuberculosis: Practical Review for Implementation in Routine”
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37623938/>
  
- ✳ Ministero della salute., 2023. “Malattie Infettive: Tubercolosi – Terapia”
  - <https://www.salute.gov.it/portale/malattieInfettive/dettaglioSchedeMalattieInfettive.jsp?lingua=italiano&id=208&area=Malattie%20infettive&menu=indiceAZ&tab=6>
  
- ✳ Ministero della salute., 2023. “I casi di tubercolosi in Italia- Periodo 2009-2021”.
  - [https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_3387\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_3387_allegato.pdf)
  
- ✳ Omar – Registro Irene (Osservatorio Italiano delle Micobatteriosi Polmonari Non tubercolari.
  - <https://www.registroirene.it/it/Pubblicazioni>
  
- ✳ Seremi report ASL-AL., edizione 2019. “La Tubercolosi in Piemonte”
  - <https://www.seremi.it/sites/default/files/Report%20TB%20Piemonte%202018.pdf>
  
- ✳ Seremi report ASL-AL., edizione 2023. “La tubercolosi in Piemonte”.
  - [https://www.seremi.it/sites/default/files/Report%20TB%20Piemonte%202022%20%28ed.%202023%29\\_0.pdf](https://www.seremi.it/sites/default/files/Report%20TB%20Piemonte%202022%20%28ed.%202023%29_0.pdf)
  
- ✳ Swetalina Pradhan et al., 2021. “Screening of Latent Tuberculous Infection (LTBI) before Starting Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Patients with Psoriasis: A Primer for Clinical Dermatologist”.
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35068505/>
  
- ✳ Terracciano Elisa., 2020. “Tuberculosis: an ever present disease but difficult to prevent”.
  - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32668448/>
  
- ✳ Thomas R.Hawn et al., 2014. “Tuberculosis Vaccines and Prevention of Infection”
  - <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/membr.00021-14>

- ✳ Timothy F. Brewer., 2000. " Preventing Tuberculosis with Bacillus Calmette-Guérin Vaccine: A Meta-Analysis of the Literature"
- [https://academic.oup.com/cid/article/31/Supplement\\_3/S64/331049](https://academic.oup.com/cid/article/31/Supplement_3/S64/331049)
  
- ✳ Tortoli E., Manuale di microbiologia clinica ed. 2008
- ✳ Tortoli E., 2014. "Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus Mycobacterium"
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278573/>
  
- ✳ WHO., 2010. "Treatment of Tuberculosis: Guidelines 4<sup>th</sup> edition"
- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138748/pdf/Bookshelf\\_NBK138748.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138748/pdf/Bookshelf_NBK138748.pdf)
  
- ✳ WHO., 2015. "The End TB Strategy".
- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331326/WHO-HTM-TB-2015.19-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  
- ✳ WHO., 2017. "Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care".
- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/255052/9789241550000-eng.pdf?sequence=1>
  
- ✳ WHO., 2018. " Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis."
- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf?sequence=1>
  
- ✳ WHO., 2021. " WHO announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis"
- <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>
  
- ✳ WHO., 2022. "Global Tuberculosis Report".
- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363752/9789240061729-eng.pdf?sequence=1>
  
- ✳ WHO., 2023. "Global Tuberculosis Report".
- <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/9789240083851-eng.pdf?sequence=1>

## ***SITOGRAFIA FIGURE***

- \* Figure 2, 3, 4, 5, 6, 7: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/9789240083851-eng.pdf?sequence=1>
- \* Figura 8: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/tuberculosis-surveillance-monitoring-2023.pdf>
- \* Figure 9, 10, 11, 12: [https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_publicazioni\\_3387\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_publicazioni_3387_allegato.pdf)
- \* Figure 13, 14, 15: [https://www.seremi.it/sites/default/files/Report%20TB%20Piemonte%202022%20%28ed.%202023%29\\_0.pdf](https://www.seremi.it/sites/default/files/Report%20TB%20Piemonte%202022%20%28ed.%202023%29_0.pdf)
- \* Figura 16: [https://it.wikipedia.org/wiki/Test\\_di\\_Mantoux#:~:text=L'intradermoreazione%20alla%20tubercolina%20%C3%A8,da%20Felix%20Mendel%20nel%201908](https://it.wikipedia.org/wiki/Test_di_Mantoux#:~:text=L'intradermoreazione%20alla%20tubercolina%20%C3%A8,da%20Felix%20Mendel%20nel%201908)
- \* Figura 17: <https://microbenotes.com/middlebrook-agar>
- \* Figura 19: <https://microbenotes.com/lowenstein-jensen-lj-media/>
- \* Figure 20, 21: <https://www.bd.com/en-us/products-and-solutions/products/product-families/bd-bactec-mgit-automated-mycobacterial-detection-system>
- \* Figure 22, 23: <https://www.cephheid.com/it-IT/tests/tb-emerging-infectious-diseases/xpert-mtb-rif-ultra.html>
- \* Figure 24, 25, 26: <https://www.fujirebio.com/en-us>
- \* Figure A e B: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/iseq-100-sequencing-system-spec-sheet-770-2017-020-translations/iseq-100-sequencing-system-spec-sheet-770-2017-020-ita.pdf>
- \* Figure 29, 30: [https://www.arrowdiagnostics.it/download/microbiologia/micobatterings/BROCHURE\\_Deeplex%20Myc-TB.pdf](https://www.arrowdiagnostics.it/download/microbiologia/micobatterings/BROCHURE_Deeplex%20Myc-TB.pdf)
- \* Figura 32: <https://www.mdpi.com/2076-0817/12/8/978>