



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

**DIPARTIMENTO DI RICERCA TRASLAZIONALE E DELLE
NUOVE TECNOLOGIE IN MEDICINA E CHIRURGIA**

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Direttore: Prof. Carlo Garzelli

UTILITA' CLINICA DEL TEST QUANTIFERON-TB GOLD IN-TUBE PER LA DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI NEI PAZIENTI PEDIATRICI

Tesi di Specializzazione

Presentata da:
Dott.ssa GIULIA LOMBARDI

Relatore:
Prof. CARLO GARZELLI

Correlatori:
Prof.ssa MARIA PAOLA LANDINI
Dott.ssa PAOLA DAL MONTE

Indice

Riassunto	1
1 Introduzione	3
1.1 Tubercolosi	3
1.1.1 Epidemiologia	3
1.1.2 Agente eziologico	6
1.1.3 Trasmissione	9
1.1.4 Immunopatogenesi	10
1.1.5 Istopatologia	14
1.2 Manifestazioni cliniche	18
1.2.1 Tubercolosi polmonare	18
1.2.2 Tubercolosi extra-polmonare	19
1.3 Diagnosi microbiologica	23
1.3.1 Esame microscopico diretto	23
1.3.2 Esame colturale	24
1.3.3 Tecniche molecolari	25
1.4 Diagnosi immunologica	27
1.4.1 Test Cutaneo Tubercolinico	27
1.4.2 Test IGRA (Interferon- γ release assay): T-SPOT.TB e Quantiferon-TB Gold In-Tube	28
1.5 Tubercolosi in età pediatrica	31
1.5.1 Epidemiologia della tubercolosi pediatrica	31
1.5.2 Diagnosi della tubercolosi pediatrica	32
2 Scopo della tesi	35
3 Materiali e metodi	36
3.1 Popolazione in studio	36
3.2 Diagnosi microbiologica	36
3.2.1 Esame microscopico	37
3.2.2 Esame colturale	37

3.2.3	Test di sensibilità ai farmaci anti-tubercolari	39
3.2.4	GeneXpert MTB/RIF	40
3.3	Quantiferon-TB Gold In-Tube	41
3.3.1	Immunodosaggio	42
3.3.2	Elaborazione dei risultati	43
3.4	Test cutaneo tubercolinico	45
3.5	Definizione dei gruppi diagnostici	45
3.6	Analisi statistica	46
4	Risultati	47
4.1	Descrizione della popolazione in studio	47
4.2	Risultati qualitativi del test Quantiferon-TB Gold In-Tube e del Test Cutaneo Tubercolinico	49
4.3	Concordanza tra il test Quantiferon-TB Gold In-Tube e il Test Cutaneo Tubercolinico	52
4.4	Sensibilità del test Quantiferon-TB Gold In-Tube e del Test Cutaneo Tubercolinico in pazienti sintomatici	59
4.5	Quantiferon-TB Gold In-Tube indeterminati	61
4.6	Analisi quantitativa del test Quantiferon-TB Gold In-Tube in base alla diagnosi	63
4.7	Analisi quantitativa del test Quantiferon-TB Gold In-Tube in base all'età	68
5	Discussione	72
6	Bibliografia	77
	Ringraziamenti	86

Riassunto

La diagnosi di tubercolosi (TB) nei pazienti pediatrici è spesso difficile, perché l'infezione può essere asintomatica o presentare sintomi aspecifici e la malattia è generalmente paucibacillare. L'identificazione e il trattamento tempestivo dell'infezione tubercolare latente (ITBL) nei bambini rappresentano quindi un passo cruciale nel programma di controllo della tubercolosi pediatrica. A tal fine, il Test Cutaneo Tubercolinico (TCT) è ancora convenzionalmente utilizzato nonostante i suoi limiti. I nuovi test immunologici basati sul rilascio di Interferon- γ (IFN- γ), quale il test Quantiferon-TB Gold In-Tube (QFT-IT) utilizzato in questo studio, presentano diversi vantaggi, tra cui un controllo (Mitogeno) della reattività immunitaria del paziente; tuttavia il loro valore diagnostico nei bambini è ancora oggi oggetto di dibattito.

Scopo di questo studio è stato valutare le performance diagnostiche del test QFT-IT, in confronto con il TCT, in un'ampia coorte di bambini sottoposti a screening per infezione tubercolare in un'area italiana a bassa incidenza di tubercolosi, ma con alti flussi migratori.

E' stata condotta un'analisi retrospettiva qualitativa e quantitativa dei risultati del test QFT-IT eseguito su 517 bambini di età compresa tra 0 e 16 anni valutati presso l'Unità di Pediatria del Policlinico Universitario S. Orsola-Malpighi di Bologna durante un periodo di 5 anni. Trecentottantaquattro bambini (74,3%) erano stati testati anche con il TCT. I risultati e la concordanza tra i 2 test sono stati analizzati in base alla vaccinazione con BCG, al Paese di origine, al motivo dello screening, alla diagnosi e all'età.

Nella popolazione in studio l'età media era di $5,4 \pm 4,0$ anni e 288 (55,7%) bambini erano di sesso maschile. Novantotto (19,0%) bambini erano nati in Paesi a media/alta endemia per TB; dei 412 (79,7%) bambini nati in Italia, 197 (38,1%) erano nati da famiglie immigrate da Paesi a media/alta endemia tubercolare.

I bambini erano stati sottoposti allo screening per infezione tubercolare per diversi motivi: 176 (34,1%) per sospetto clinico di tubercolosi attiva, 258 (49,9%) per screening dei contatti, 42 (8,1%) per recente immigrazione da Paesi endemici per TB e 11 (2,1%) per screening pre-terapia immunosoppressiva. A questi, sono stati aggiunti 30 (5,8%) bambini come controlli negativi.

In base alla diagnosi finale, i bambini sono stati classificati in 5 gruppi diagnostici: TB attiva (n=45, 8,7%), infezione tubercolare latente (n=38, 7,4%), TB esclusa con diagnosi alternativa (n=159, 30,7%), esposizione (n=245, 47,4%) e controlli negativi

(n=30, 5,8%). In funzione dell'età, i bambini sono stati suddivisi in 4 fasce: 109 (21,1%) bambini tra 0 e 1,9 anni, 173 (33,5%) tra 2 e 4,9 anni, 154 (29,8%) tra 5 e 9,9 anni, 81 (15,6%) tra 10 e 16 anni.

Nel totale, il test QFT-IT è risultato positivo in 79 (15,3%) bambini, negativo in 418 (80,8%) e indeterminato in 20 (3,9%). Tra i 384 bambini testati anche con il TCT, 76 sono risultati positivi (19,8%), 290 (75,5%) negativi e 18 (4,7%) intermedi.

La concordanza totale tra i due test è stata dell'89,9% ed è risultata statisticamente influenzata dalla vaccinazione con BCG ($p < 0,0001$). Il test QFT-IT ha rilevato i casi di ITBL meglio del TCT con una concordanza tra i due test che si è dimostrata bassa (33,3%-73,3%) in tutte le fasce d'età. La sensibilità per la diagnosi di TB attiva nei bambini sintomatici è risultata maggiore per il QFT-IT rispetto al TCT (93,3% vs 86,5%), soprattutto nei bambini < 2 anni, mentre la specificità è risultata elevata per entrambi i test, rispettivamente 99,3% e 98,9%.

L'analisi quantitativa dei risultati del test QFT-IT ha evidenziato che i valori di IFN- γ in risposta al controllo negativo sono stati statisticamente più alti nei casi di TB attiva ($p < 0,0001$). Le mediane dei valori di IFN- γ in risposta agli antigeni specifici di MTB sono risultate rispettivamente 6,63 e 3,39 UI IFN- γ /ml nei casi di TB attiva e di ITBL; tuttavia questa differenza non era statisticamente significativa.

I pochi (3,9%) casi risultati indeterminati al test QFT-IT non erano associati alla diagnosi di infezione tubercolare né attiva né latente, ma sono stati riscontrati nei bambini dove la diagnosi di TB era stata esclusa ($p < 0,0001$). Ciò è stato confermato dall'analisi quantitativa dei valori di IFN- γ in risposta al Mitogeno risultati più bassi nei bambini con diagnosi alternativa alla TB. Sebbene i valori di IFN- γ in risposta al Mitogeno siano risultati crescere in maniera statisticamente significativa all'aumentare dell'età ($p = 0,0002$), tuttavia i risultati indeterminati non erano distribuiti diversamente tra i gruppi di età, avallando l'utilizzo del test QFT-IT anche nei bambini più piccoli.

In conclusione, i risultati ottenuti hanno evidenziato le migliori performance del test QFT-IT rispetto al TCT nella diagnosi di ITBL e TB attiva. La bassa percentuale di risultati indeterminati al test QFT-IT dimostra che nella pratica clinica le preoccupazioni relative all'utilizzo di tale test nei bambini a causa del loro sistema immunitario immaturo non ne limitano l'uso. Questo studio incoraggia quindi l'uso preferenziale del test QFT-IT come strumento di supporto per la diagnosi e la gestione della tubercolosi in una popolazione a rischio quale quella pediatrica.

1 Introduzione

1.1 Tubercolosi

La tubercolosi (TB) rappresenta ancora oggi un'emergenza mondiale e un importante problema di salute pubblica; inoltre, in seguito alla diffusione del Virus dell'Immunodeficienza acquisita (HIV) e delle terapie immunosoppressive, alla crescente immigrazione dai Paesi ad alta endemia tubercolare e all'aumento della diffusione di ceppi *MultiDrug Resistant* (MDR) essa costituisce motivo di preoccupazione per la sanità pubblica anche nelle aree geografiche industrializzate.

La tubercolosi è stata ampiamente studiata; l'agente eziologico di questa malattia, *Mycobacterium tuberculosis*, è stato scoperto nel 1882 dal microbiologo tedesco Robert Koch. Dal 1882 ad oggi ci sono stati grandi sviluppi nella diagnosi e nella terapia di questa malattia, che è stata e rimane tuttora una delle principali cause di morte nel mondo.

1.1.1 Epidemiologia

La tubercolosi resta la malattia infettiva da singolo agente patogeno a più elevata mortalità nel mondo, nonostante il numero di persone che si ammalano sia in costante declino e il tasso di mortalità sia sceso del 40% dal 1990.

L'ultima relazione annuale sulla TB dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), pubblicata nel 2015 e riferita all'anno 2014, parla di 9,6 milioni di nuovi casi (range 9,1 – 10,0 milioni) nel mondo, di cui il 12% in pazienti HIV-positivi, corrispondenti a un'incidenza globale di 133 casi/100000 abitanti.¹ Il numero di casi è aumentato rispetto a quello del precedente report, 9 milioni nell'anno 2013, ma ciò è dovuto ad un aumento del numero di segnalazioni nel 2014. Il tasso di mortalità rimane alto, con 1,5 milioni di decessi nel 2014 compresi 400.000 soggetti HIV-positivi. Queste morti rimangono inaccettabili, dato che la maggior parte sarebbe prevenibile con una diagnosi tempestiva e una corretta terapia.

Dei 9,6 milioni di nuovi casi il 58% proviene dal Sud-Est Asiatico e dalle regioni del Pacifico Occidentale, mentre il 28% dalla Regione Africana dove si riscontra il tasso di incidenza più alto (281 casi/100000 abitanti) (figura 1).

Nel 2014 sono stati segnalati circa 1,2 milioni di nuovi casi di TB in persone infette da HIV, il 74% dei quali nella Regione Africana. Dal 2004 il tasso di mortalità nei co-

infetti è diminuito del 32%, nel 2014 le morti per TB in pazienti HIV positivi hanno rappresentato circa il 25% del totale.

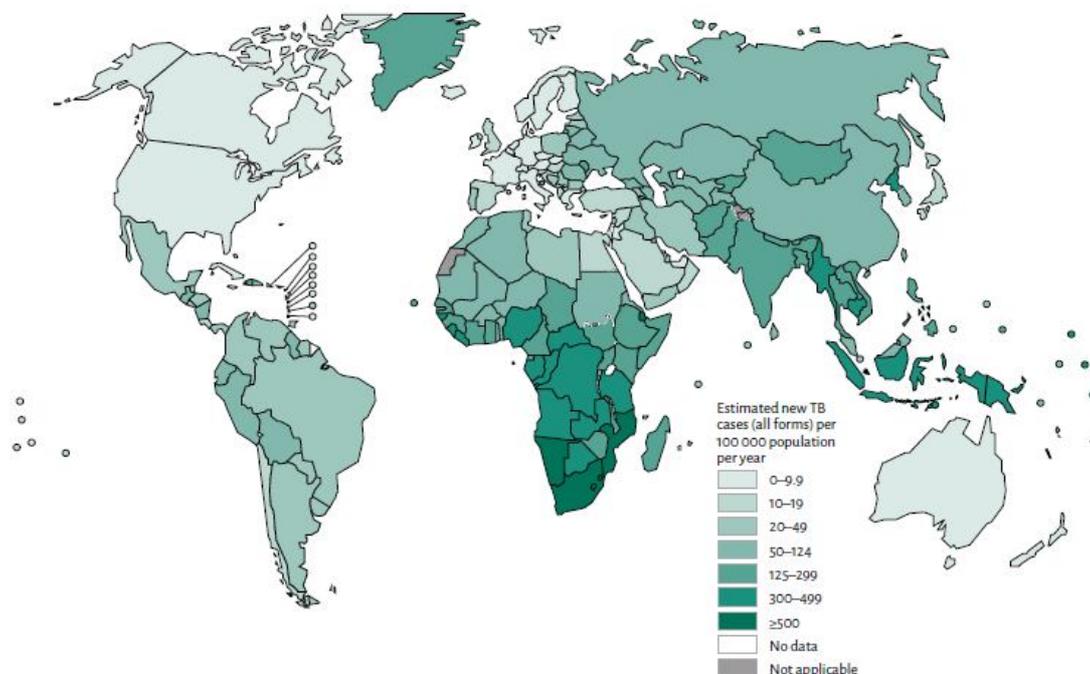


Figura 1 Incidenza della tubercolosi a livello mondiale nell'anno 2014 dal rapporto 2015 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità

Dal punto di vista strategico, il 2015 è un anno di transizione nella lotta alla tubercolosi, rappresenta il termine dei *Millenium Development Goals* (MDGs) e l'inizio dei *Sustainable Development Goals* (SDGs). Si passa dalla strategia Stop TB (2006-2015), i cui obiettivi erano la riduzione dell'incidenza e il dimezzamento della prevalenza e del tasso di mortalità entro il 2015 (figura 2), alla strategia End TB (2016-2035). Gli obiettivi di quest'ultima consistono nella riduzione del 90% della mortalità entro il 2030 dell'80% dei nuovi casi (figura 3).

STOP TB STRATEGY (2006-2015)	
VISION	A TB-free world
GOAL	To dramatically reduce the global burden of TB by 2015 in line with the Millennium Development Goals (MDGs) and the Stop TB Partnership targets
OBJECTIVES	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Achieve universal access to high-quality care for all people with TB ▪ Reduce the human suffering and socioeconomic burden associated with TB ▪ Protect vulnerable populations from TB, TB/HIV and drug-resistant TB ▪ Support development of new tools and enable their timely and effective use ▪ Protect and promote human rights in TB prevention, care and control
TARGETS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MDG 6, Target 6.c: Halt and begin to reverse the incidence of TB by 2015 ▪ Targets linked to the MDGs and endorsed by the Stop TB Partnership: <ul style="list-style-type: none"> — 2015: reduce prevalence of and deaths due to TB by 50% compared with a baseline of 1990 — 2050: eliminate TB as a public health problem (defined as <1 case per 1 million population per year)

Figura 2 Sintesi della strategia Stop TB promossa dall'Organizzazione Mondiale della Sanità

END TB STRATEGY (2016-2035)				
VISION	A WORLD FREE OF TB — zero deaths, disease and suffering due to TB			
GOAL	END THE GLOBAL TB EPIDEMIC			
INDICATORS	MILESTONES		TARGETS	
	2020	2025	SDG 2030 ^a	End TB 2035
Reduction in number of TB deaths compared with 2015 (%)	35%	75%	90%	95%
Reduction in TB incidence rate compared with 2015 (%)	20% (<85/100 000)	50% (<55/100 000)	80% (<20/100 000)	90% (<10/100 000)
TB-affected families facing catastrophic costs due to TB (%)	0	0	0	0

Figura 3 Sintesi della strategia End TB proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità

A livello globale gli obiettivi della strategia Stop TB sono stati quasi raggiunti: l'incidenza è diminuita dell'1,2% ogni anno dal 2000, il tasso di mortalità del 47% e la prevalenza del 42%. Tutti e tre gli obiettivi sono stati raggiunti nella Regione delle Americhe, nel Sud-Est Asiatico e nelle Regioni del Pacifico occidentale, e in 9 dei paesi ad elevata endemia.

A livello europeo i dati vengono raccolti e valutati congiuntamente dall'Ufficio Regionale per l'Europa dell'OMS e dall'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC). Nell'ultimo report prodotto dall'ECDC nell'anno 2016 e riferito

all'anno 2014, si stima che nella regione europea si siano verificati 340000 nuovi casi di TB (range 320000-350000), equivalenti a un'incidenza media di 37,5 casi/100000 abitanti. Se si considera l'Unione Europea il numero di nuovi casi di TB scende a 58008 corrispondenti a una incidenza del 13,2 casi/100000 abitanti.²

La situazione epidemiologica della tubercolosi in Italia, definita dal sistema di notifica dei casi del Ministero della Salute, è caratterizzata da una bassa incidenza nella popolazione generale, dalla concentrazione della maggior parte dei casi in alcuni gruppi a rischio (immigrati, pazienti sottoposti a terapie biologiche) ed in alcune fasce di età e dall'emergere di ceppi tubercolari multiresistenti. Secondo i dati dell'Istituto Superiore di Sanità relativi al 2008, in tale anno sono stati notificati in Italia 4418 casi di TB,³ mentre rispetto all'anno 2014 l'ECDC riporta per l'Italia 3153 casi,² in linea con un trend in calo a lungo termine. Infatti nell'ultimo decennio l'incidenza è diminuita da 7 a 5 casi/100000 abitanti; comunque al di sotto della soglia che definisce un Paese a bassa prevalenza. Contestualmente, il numero di casi di TB in persone nate all'estero è più che raddoppiato fino a raggiungere il 46% dei casi totali. In particolare, nel 2011 nella regione Emilia-Romagna sono stati notificati 437 nuovi casi di TB corrispondente a un tasso di incidenza di 10,7 casi/100.000 abitanti.⁴

Nel contesto oggetto di questo studio, l'area metropolitana di Bologna, l'ultimo report relativo all'anno 2011 riporta un'incidenza di 12,1 casi/100000 abitanti. Questo dato colloca il setting in studio al limite tra la bassa e media incidenza tubercolare con un trend in significativo aumento nel numero dei casi a carico degli stranieri (67,5%) per gli alti flussi migratori.⁵

1.1.2 Agente eziologico

La TB è causata nell'uomo da micobatteri appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis complex*, che comprende le specie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (Bacillo di Calmette-Guerin), *M. africanum*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. canettii*. Tutte queste specie sono patogene, ad eccezione di *M. bovis* BCG e *M. microti* che causano malattia solo occasionalmente.

Al microscopio i micobatteri appaiono come bacilli di piccole dimensioni (0,2-0,6 x 1-10 µm). Sono aerobi obbligati, immobili, asporigeni e crescono preferibilmente a 37° C.

Mycobacterium tuberculosis (MTB) presenta caratteristiche condivise con tutti gli altri membri del genere *Mycobacterium*. *M. tuberculosis* è un aerobio obbligato, cresce ad una temperatura ottimale di 37 °C e presenta un tempo di replicazione elevato che può variare dalle 18 alle 24 ore. Quest'ultima caratteristica contribuisce alla natura cronica della malattia, imponendo lunghi periodi di trattamento, e fa sì che lo sviluppo

microbico in coltura primaria sia apprezzabile solo dopo alcune settimane (3-6) di incubazione.⁶

Questo batterio cresce preferibilmente in tessuti ad alta pressione parziale di ossigeno, come gli apici polmonari. Il bacillo è inoltre in grado di modificare il proprio stato metabolico entrando in una condizione di quiescenza per cui, nonostante sia presente una lesione tubercolare, l'ospite non manifesta sintomi di malattia.

M. tuberculosis presenta una parete molto complessa, che non è classificabile né come quella dei batteri Gram – né come quella dei Gram +. Numerosi aspetti dei micobatteri sono stati associati alla peculiarità della loro parete, che è caratterizzata dalla presenza di un doppio strato asimmetrico ricco in cere che rappresenta una barriera di permeabilità a molecole polari.

La superficie cellulare del batterio comprende, dall'interno verso l'esterno, la membrana plasmatica, la parete cellulare e la capsula (figura 4).

Nella membrana plasmatica si trovano ancorati proteine, mannosidi di fosfatidilinositolo (PIMs) e lipoarabinomannano (LAM): quest'ultimo svolge molte azioni immunomodulanti, contribuendo alla patogenesi delle manifestazioni cliniche: blocca diverse funzioni indotte da IFN- γ tra cui l'attività microbica dei macrofagi, inibisce l'attività della protein chinasi C e stimola la produzione di molte citochine associate ai macrofagi come TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10.⁷

La parete cellulare può essere divisa in due strati:

- il *core* costituito da peptidoglicano, arabinogalattano e acidi micolici;
- uno strato di cere costituito da lipidi anfipatici, legati non covalentemente agli acidi micolici.

Il peptidoglicano forma le fondamenta sulle quali si inseriscono gli arabinogalattani, polisaccaridi ramificati che si esterificano con gli acidi micolici.

Gli acidi micolici rappresentano la componente maggiore della parete. Si tratta di acidi grassi complessi, caratterizzati da una lunga catena di atomi di carbonio (60-90), ramificati in posizione α e con un ossidrile in posizione β . In *M. tuberculosis* sono state ritrovate tre classi di acidi micolici, che differiscono tra loro per la presenza di gruppi funzionali diversi nella componente meromicolato.

La parte più esterna dell'*envelope* del micobatterio, la capsula, è costituita da una miscela di polisaccaridi, proteine e lipidi.^{8,9}

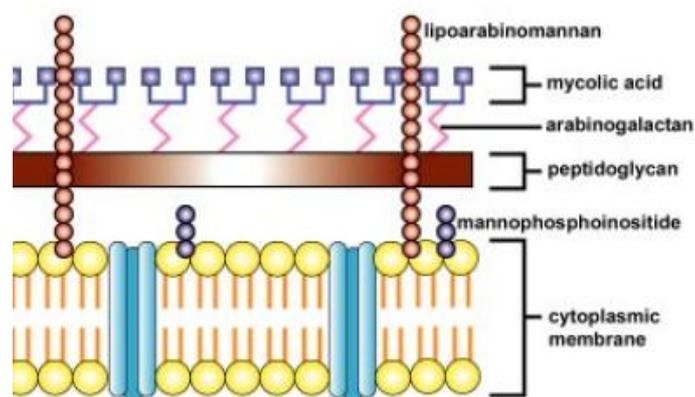


Figura 4 Rappresentazione schematica della parete dei micobatteri

Le componenti lipidiche formano il 60% del peso della parete cellulare. Nei vari strati sono disseminate proteine di trasporto e porine, che costituiscono il 15% del peso della parete. Le proteine sono antigeni biologicamente importanti, che stimolano la risposta immune cellulare del paziente all'infezione.⁶

Le caratteristiche della parete cellulare conferiscono ai micobatteri le seguenti proprietà:^{8,9}

- resistenza alla decolorazione da parte di soluzioni alcoliche acide (alcol-acido resistenza);
- resistenza ad acidi e basi forti, alcali e ipoclorito;
- impossibilità di accesso a molti antimicrobici come i β -lattamici;
- resistenza alle proprietà battericide delle cellule fagocitiche;
- lenti scambi metabolici da cui dipende il ridotto ritmo di replicazione.

M. tuberculosis non cresce sui comuni terreni di coltura, ma solo su quelli arricchiti con sostanze complesse. Si possono utilizzare terreni a base di tuorlo d'uovo: sono molto sfruttati per l'isolamento primario e sono disponibili in numerose formulazioni. Essi consistono, in genere, in una miscela di soluzione tampone e giallo d'uovo, fatta coagulare a becco di clarino in provette tenute per qualche tempo a 65-70°C. Questi terreni contengono anche varie concentrazioni di verde di malachite per impedire lo sviluppo di specie microbiche sfuggite ai processi di decontaminazione del campione biologico, e l'aggiunta di glicerolo (per favorire lo sviluppo di *M. tuberculosis*). Tra questi ricordiamo i terreni solidi di Lowenstein-Jensen (uova, sali, glicerolo, patata e verde di malachite) e di Petraghani (uova, patata, latte, glicerolo e verde di malachite). Nei terreni liquidi, e nel caso di micobatteri virulenti, è ben evidente la tendenza a crescere in cordoni formati da numerosi bacilli allineati in lunghe file parallele: questa caratteristica è in base delle proprietà idrofobiche della superficie cellulare, ed in

particolare della presenza del fattore cordale, un glicolipide associato agli acidi micolici.¹⁰

1.1.3 Trasmissione

La tubercolosi si trasmette per contagio interumano, più raramente per contatto con materiali infetti. L'abituale sorgente di infezione è rappresentata dalle goccioline di Pflugge di un paziente affetto da tubercolosi polmonare aperta bacillifera: quest'ultimo in genere presenta una forma polmonare cavitaria, o più raramente una lesione laringea, che determina la presenza di bacilli nell'espettorato (10^5 - 10^7 bacilli alcol-acido resistenti/ml). Altri possibili veicoli sono le urine (tubercolosi renale) e il pus dei focolai ossei.

La più frequente via di infezione è, pertanto, quella aerogena in seguito dell'inalazione delle goccioline aerosolizzate, dette *droplet nuclei*, emesse nell'ambiente dal malato attraverso colpi di tosse, gli starnuti e la fonazione (figura 5). Si contano circa 3000 nuclei di goccioline bacillifere per ogni colpo di tosse; le più piccole (5 - $10\ \mu\text{m}$ di diametro) possono rimanere in sospensione in aria per diverse ore ed essere inalate nelle vie aeree successivamente.¹¹

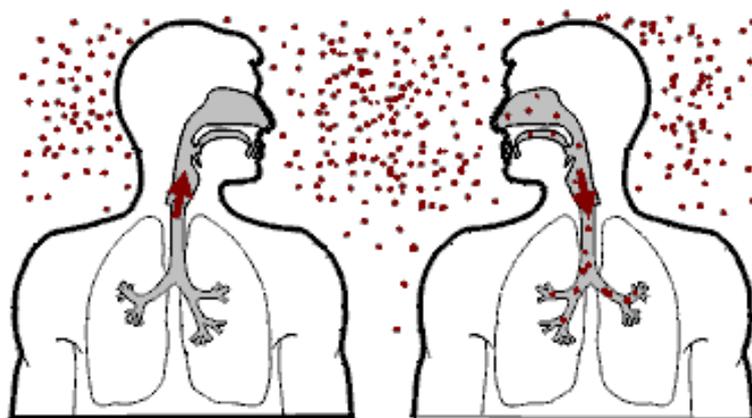


Figura 5 Trasmissione della tubercolosi per via aerogena mediante goccioline di Pflugge

Fattori determinanti per la trasmissione sono la probabilità di contatto con una persona che ha una forma infettiva di tubercolosi, l'intimità e la durata del contatto con la persona contagiosa, il grado di contagiosità del caso e l'ambiente condiviso in cui avviene il contatto.¹²

Diversi studi di situazioni *close-contact* hanno chiaramente dimostrato che i malati di tubercolosi in cui l'espettorato contiene bacilli alcol-acido-resistenti visibili al microscopio sono i più propensi a trasmettere l'infezione. I pazienti con espettorato

microscopico-negativo/coltura-positiva sono meno contagiosi e quelli con la coltura negativa sono essenzialmente non infettivi.¹²

Nella maggior parte dei casi vi è un ritardo diagnostico, per questo motivo si stima che un caso di TB con espettorato positivo potrebbe aver infettato una ventina di persone prima di poter essere identificato.

1.1.4 Immunopatogenesi

Lo sviluppo e l'evoluzione dell'infezione tubercolare sono condizionati da diversi fattori, tra i quali il più determinante è rappresentato dallo stato immunitario dell'ospite. L'interazione tra *M. tuberculosis* e l'ospite umano inizia nel momento in cui vengono inalati i nuclei di goccioline infette contenenti i microrganismi (figura 6). La maggior parte di essi viene trattenuta ed eliminata dalla clearance muco ciliare respiratoria, cosicché solo una frazione pari al 10% del totale raggiunge gli alveoli. A tale livello i macrofagi alveolari, non specificatamente attivati, fagocitano i bacilli, ma la loro attività batteriostatica è probabilmente minima.

L'equilibrio che si stabilisce tra la base macrofagica e la virulenza dei micobatteri si correla sia alla composizione della parete cellulare, ricca di lipidi, sia alla capsula glicolipidica che conferiscono resistenza al complemento e ai radicali liberi del fagocita. Vi sono due possibili evoluzioni: i macrofagi limitano la moltiplicazione bacillare oppure i micobatteri proliferano lisando i macrofagi. In tale caso la replicazione dei bacilli intracellulari procede per settimane sia nel focus alveolare sia a livello di foci metastatici linfoematogeni.^{13,14}

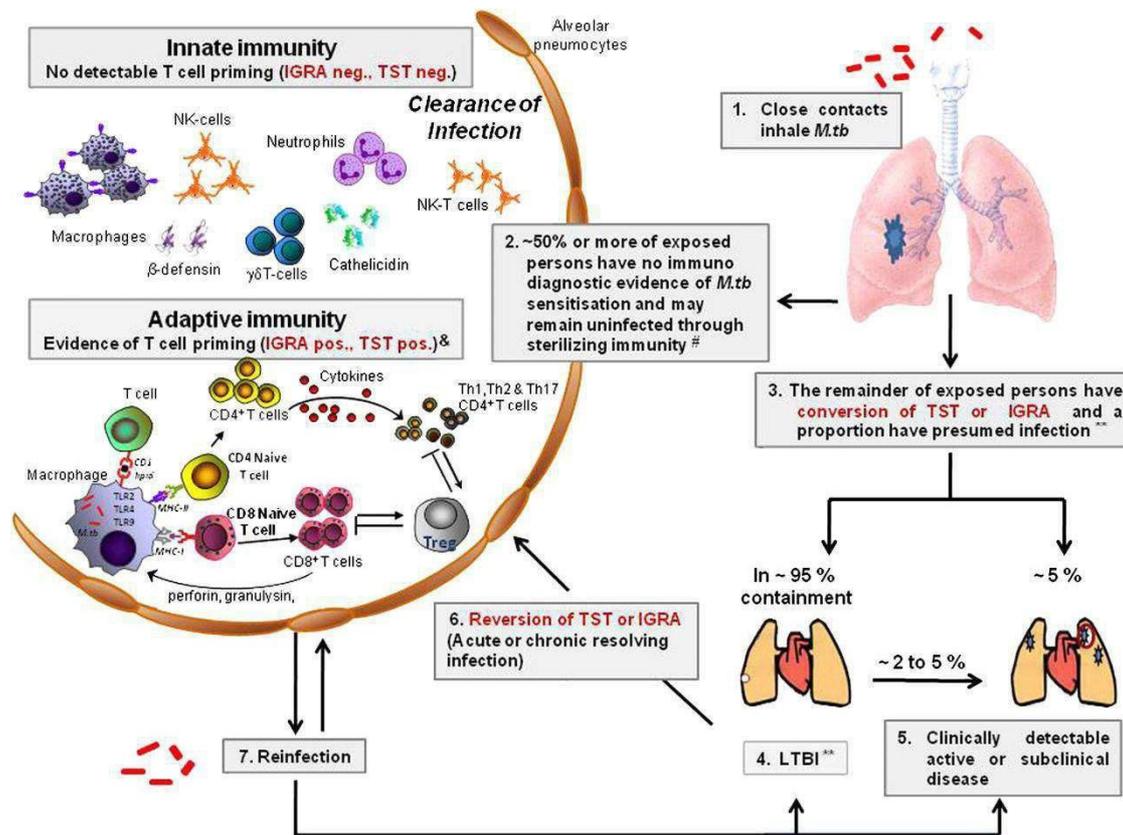


Figura 6 Rappresentazione schematica del meccanismo immunopatogenetico della tubercolosi

Quando, in risposta all'infezione da *M. tuberculosis* i macrofagi si attivano, acquisiscono la piena competenza della loro attività battericida e si innesca la risposta cellulo-mediata. La reazione è antigene-specifica e richiede il fondamentale intervento dei linfociti T CD4+ (figura 6). I macrofagi processano e presentano gli antigeni micobatterici esponendoli in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II) ad una popolazione T CD4+ vergine capace di riconoscere, attraverso il TCR $\alpha\beta$, il complesso Ag-MHC II espresso sulla superficie dell'APC. L'interazione comporta in sequenza l'attivazione, la proliferazione clonale dei linfociti T e la secrezione di un ampio spettro di linfocine che intervengono nel processo di attivazione macrofagica, in seguito al quale aumenta la concentrazione di enzimi litici e di metaboliti intermedi che aumentano l'attività di *killing* intracellulare dei macrofagi. In particolare si verifica una preferenziale differenziazione dei linfociti T CD4+ attivati verso la sottopopolazione Th1. Le due sottopopolazioni di linfociti T CD4+ helper producono effetti diametralmente opposti sull'attivazione macrofagica: i Th1 esplicano un'influenza stimolatoria attraverso la produzione di IL-2, TNF- α , invece i Th2 mediante IL-10 e altre citochine esercitano un'azione inibitoria. Il rapporto tra le due sembrerebbe dipendere, almeno in parte, dal tipo e dalla qualità

degli antigeni presenti.¹³ Il pattern citochinico prodotto dai linfociti e dai macrofagi attivati rende ragione della complessa cascata di eventi nei quali si articola l'intero processo immunopatogenetico dell'infezione tubercolare:¹⁵

- IL-12: è una citochina prodotta dai macrofagi, svolge un ruolo primario nell'induzione della risposta Th1; il contatto con i CD4+ aumenta la sintesi di IL12 che agisce in modo paracrino sui linfociti, stimolandone la differenziazione verso i Th1, nonché l'attivazione. E' anche un potente induttore della secrezione di IFN- γ da parte delle cellule T e NK;
- IFN- γ : è uno dei mediatori più importanti, viene prodotto dai CD4+ ed agisce come potente attivatore dei macrofagi, amplificando la produzione di IL-12. Gli effetti attivanti di IFN- γ si traducono in: maggiore capacità di fagocitosi, aumento del numero di molecole MHC II sulla superficie cellulare (che facilita la presentazione degli antigeni), incremento della sintesi di fattori di crescita polipeptidici, come PDGF e TGF- β , che a loro volta stimolano la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi di collagene;
- IL-2: induce la proliferazione dei linfociti T CD4+ sia con un meccanismo autocrino sia paracrino, favorendo lo *switch* verso la sottopopolazione Th1;
- TNF- α : esercita un ampio spettro di azioni sulle cellule endoteliali: aumento della sintesi di prostaciline con vasodilatazione locale, maggiore espressione delle E-selectine che promuovono l'adesione di linfociti e monociti all'endotelio, secrezione di fattori chemiotattici come IL-8. L'azione combinata di questi mediatori promuove la diapedesi delle cellule immunocompetenti verso il focus infiammatorio.

A livello della sede dell'infezione primaria si verifica la formazione di lesioni costituite procedendo dall'esterno all'interno da linfociti, macrofagi attivati, noti anche con il nome di cellule epitelioidi e cellule di Langhans; quest'ultime sono cellule giganti plurinucleate con nuclei periferici derivanti dalla fusione di singoli macrofagi. Al centro si produce un'area di necrosi che costituisce il risultato della più immediata delle risposte che l'organismo mette in atto per contenere l'infezione, a discapito, tuttavia, dell'integrità anatomica tissutale.^{16,17}

Alla distruzione tissutale parteciperebbero i processi coagulativi, i composti intermedi del metabolismo azotato e ossidativo macrofagico, e alcune citochine come il TNF- α . Anche se *M. tuberculosis* può sopravvivere, la crescita è inibita in quanto l'ambiente necrotico è anossico a bassa tensione di ossigeno e pH.

Nel momento in cui interviene l'immunità cellulo-mediata, si verifica una neutralizzazione di bacilli per la potenziata attività di *killing* macrofagica, senza più distruzione tissutale (figura 7). Tuttavia, alcuni bacilli vitali possono rimanere quiescenti all'interno dei macrofagi anche per tutta la vita. Essi sono noti come

dormienti, una popolazione di micobatteri che è alla base della non eradicabilità completa dell'infezione tubercolare.

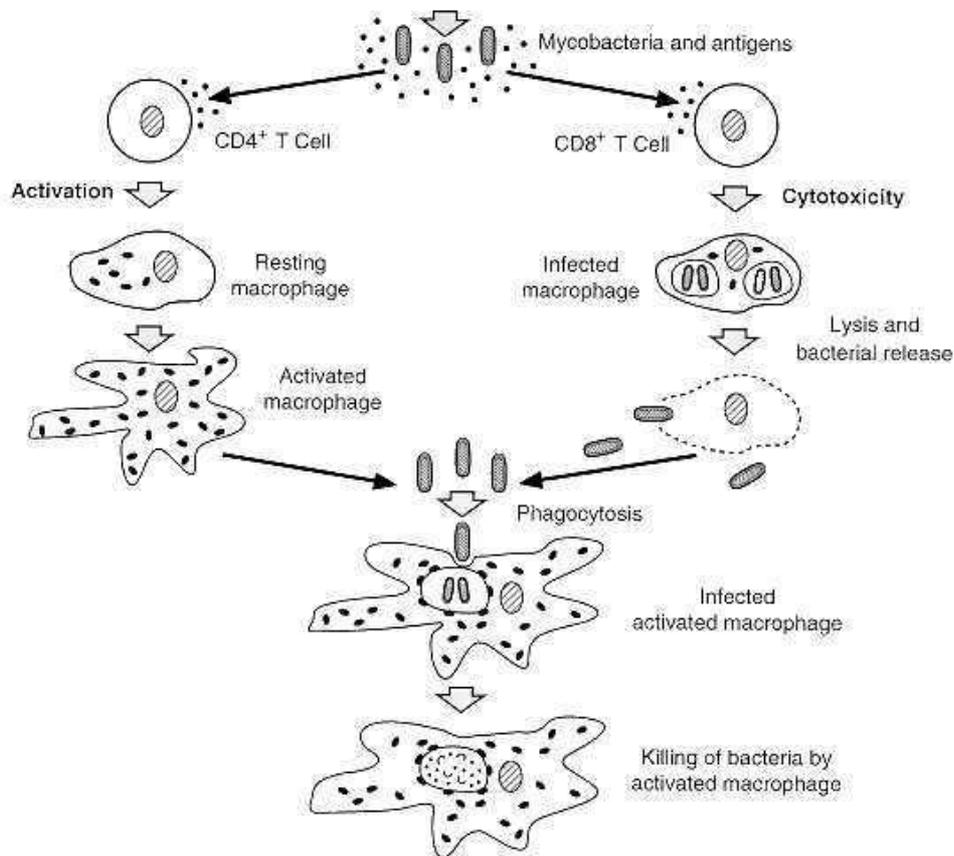


Figura 7 Interazione tra le cellule effettrici della risposta cellulo-mediata ed i micobatteri

Alcune lesioni guariscono per fibrosi e infine calcificano a livello sia parenchimale sia linfonodale. In taluni casi la risposta attivante macrofagica è debole e la proliferazione micobatterica può essere arrestata solo con una reazione di ipersensibilità di tipo ritardato molto intensa che comporta una massiva distruzione tissutale. La lesione tende a ingrandirsi, il materiale caseoso va incontro a liquefazione: le pareti bronchiali, così come i vasi, sono invase e distrutte con formazioni di caverne tubercolari, favorendo da un lato la diffusione broncogena e dall'altro quella ambientale.

L'interazione attraverso un complesso network citochinico costituisce una fase cruciale nell'elaborazione di una risposta efficiente verso l'infezione tubercolare. Un ruolo determinante è rivestito dai CD4+: patologie nelle quali vi sono difetti qualitativi e/o quantitativi di tali cellule, di cui è paradigma l'infezione da HIV, si caratterizzano per una incapacità di contenere la proliferazione micobatterica, aumentando in modo significativo le probabilità di evoluzione verso la malattia. Ciò discende dal fatto che i

linfociti CD4+ sono la fonte principale di sintesi di IFN- γ , la cui base è quella di rendere competenti i macrofagi. Inoltre è nota una popolazione di linfociti T dotati di recettore $\gamma\delta$ che proliferano in risposta agli antigeni micobatterici, sebbene il loro ruolo non sia ancora del tutto definito. I fattori di virulenza dei micobatteri, in particolar modo gli antigeni proteici, hanno una peculiare capacità di stimolare simultaneamente i macrofagi a sintetizzare un pattern citochinico (IL-10 e TGF- β) inibente il rilascio di IFN- γ e IL-12. La parziale soppressione dell'attività cellulomediata contribuirebbe così a generare uno stato di immunodepressione, a ridurre la base effettrice macrofagica, nonché a favorire la progressione della malattia tubercolare

1.1.5 Istopatologia

La risposta istopatologica a *Mycobacterium tuberculosis* è costituita da necrosi caseosa, flogosi di tipo produttivo ed essudativo e concomitanti meccanismi di riparazione del danno tessutale. È una risposta in continua modulazione, in relazione al delicato e mutevole equilibrio tra proprietà patogene del micobatterio e potenziale difensivo e aggressivo dell'ospite, reso più valido dall'eventuale ausilio terapeutico.

Granuloma tubercolare

La tipica reazione infiammatoria di tipo produttivo, atta a contenere l'azione patogena del micobatterio, è la formazione del granuloma tubercolare o tubercolo (figura 8).¹⁰

Gli elementi peculiari del tubercolo sono:

- la caratteristica area centrale di necrosi coagulativa (morte cellulare) che coinvolge tessuto e cellule infiammatorie, ricca di materiale lipidico e priva di vasi, microscopicamente omogenea o finemente granulare. Per il suo aspetto macroscopico, compatto, bianco-giallastro, che ricorda il formaggio, tale necrosi è detta caseosa;
- gli aggregati di cellule epitelioidi, che sono cellule macrofagiche così denominate perché attivate da citochine, vanno incontro a cambi metabolici e morfologici tali da farle assomigliare a cellule epiteliali;
- le cellule giganti multinucleate formatesi dalla fusione di più macrofagi, con nuclei scuri e piccoli, disposti più spesso tipicamente a corona alla periferia dell'ampio citoplasma (cellule giganti di Langhans);
- un vallo periferico di cellule linfoidi, rare plasmacellule e, tardivamente, fibroblasti più o meno numerosi.

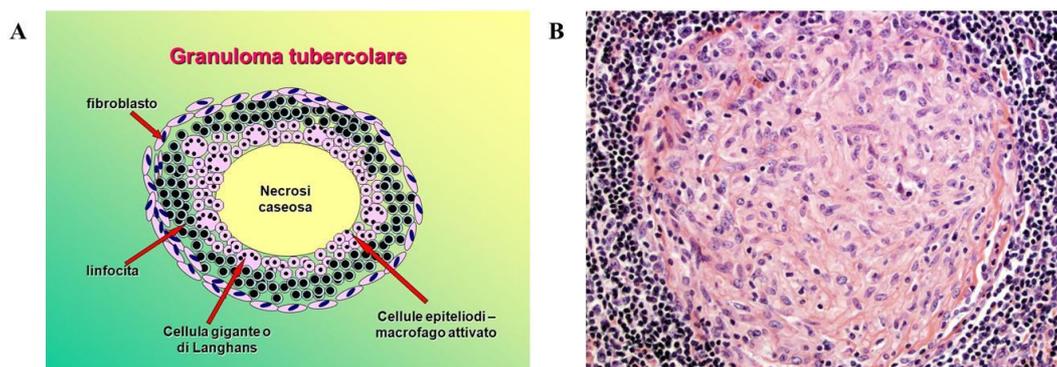


Figura 8 Granuloma tuberculare: A) schema rappresentativo e B) immagine microscopica istologica

Nell'ambiente acido e anaerobio della necrosi, i micobatteri, aerobi stretti, non riescono a moltiplicarsi e vanno spesso incontro a morte; tuttavia alcuni possono sopravvivere e rimanere in stato di latenza anche per anni. La necrosi assume quindi significato di protezione nei confronti dell'infezione, anche se ciò avviene a scapito di una più o meno estesa perdita di tessuto che può divenire clinicamente significativa. I granulomi, nei quali può prevalere la componente cellulare oppure quella necrotica, possono ingrandirsi e confluire, dando delle masse visibili macroscopicamente. Nel caso si verificano importanti fenomeni essudativo-necrotici, vi può essere colliquazione con successivo svuotamento del materiale necrotico all'esterno per via endocanalicolare (in organi quali polmone o rene), per contiguità (ad esempio nel cavo pleurico) o tramite fistolizzazione (ad esempio nei linfonodi). Micobatteri possono essere rilevati in sezioni istologiche all'interno del granuloma con colorazione di Ziehl-Neelsen o a base di fluorocromi, tuttavia la sensibilità del metodo è piuttosto bassa. Metodiche di biologia molecolare che hanno come target sequenze genomiche specifiche di *M. tuberculosis* possono essere di ausilio per segnalare e/o confermare la presenza di micobatteri in sede di lesione.

Tuberculosis primaria

La tubercolosi primaria è conseguenza del primo contatto tra il bacillo tuberculare e l'ospite mai venuto a contatto con il bacillo tuberculare. E' più comune nei bambini di età inferiore ai 5 anni, anche se sta aumentando anche negli adulti.

La risposta alla prima infezione tuberculare è rappresentata dal focolaio primario di infezione, linfadenite satellite e linfoangite interposta che costituiscono il complesso primario di Ranke. Il focolaio primario è di regola polmonare, ma il micobatterio può penetrare nell'organismo anche per via enterica (frequente prima dell'introduzione della pastorizzazione del latte e del controllo della tubercolosi bovina) o attraverso

lesioni di continuità della cute. Nel polmone il focolaio primario di Ghon, situato tipicamente in sede sub-pleurica e in aree ad alta tensione di ossigeno quali quelle contigue alla scissura fra i lobi superiori e inferiori, va incontro a fugace essudazione endoalveolare seguita da necrosi caseosa di parenchima ed essudato. Nel linfonodo satellite viene a formarsi, in seguito ad acquisizione di risposta immunitaria cellulo-mediata, il classico granuloma con un'ampia zona di necrosi caseosa; più linfonodi possono essere coinvolti successivamente. Alcuni micobatteri dal complesso primario raggiungono comunque il torrente ematico, per erosione diretta di un vaso o per via linfatica, e possono disseminare in altre parti del polmone o in altri organi a distanza, i quali rispondono con formazione di granulomi. Sedi preferenziali sono rappresentate dagli apici polmonari ad alta tensione di ossigeno, dalla corteccia cerebrale, dalla corteccia renale e dalla metafisi delle ossa. La tubercolosi primaria è dunque da considerarsi un'infezione sistemica.

Nel 90-95% dei casi il complesso primario e foci periferici vanno incontro a risoluzione spontanea, con riassorbimento parziale o totale della necrosi caseosa e susseguenti quadri di riparazione del danno tessutale con esiti in fibrosi e talora con calcificazione distrofica. Nei foci cicatriziali si possono annidare micobatteri silenti e tuttavia vitali, che costituiscono una potenziale fonte di riattivazione della malattia (infezione tubercolare latente, ITBL). Nel restante 5-10%, specie in bambini in condizione di malnutrizione o in adulti severamente immunodepressi, vi è estensione del complesso primario con massiva caseificazione e colliquazione del focolaio di Ghon o dei linfonodi ilari (tubercolosi primaria progressiva).

Le complicanze possono essere numerose e talora gravi quali: svuotamento del materiale caseoso del focolaio polmonare nel cavo pleurico (empiema pleurico) o nella vie aeree con conseguente formazione di lesioni cavitari, fistolizzazione dei linfonodi caseificati all'interno dell'albero bronchiale con broncopolmonite, erosione linfonodale in cavo pericardico (pericardite tubercolare).

Anche foci periferici localizzati in sede extra-polmonare possono evolvere in lesioni essudativo-necrotiche, dando origine a complicanze precoci, talora gravi, quali la meningite, o la malattia d'organo, spesso tubercolosi renale, ossea e articolare.

Qualora venga raggiunto il circolo per via linfatica, attraverso la vena cava superiore, o in seguito ad erosione diretta di parete vasale, si ha la disseminazione sistemica dei micobatteri per via ematogena. Negli organi raggiunti dall'infezione, in sede parenchimale, si ha formazione di innumerevoli nodulini -corrispondenti microscopicamente a granulomi- isolati, bianco-giallastri, della grandezza di qualche millimetro, somiglianti a grani di miglio, che definiscono tale forma di tubercolosi miliare. Poiché vi è immissione di micobatteri anche nel circolo sistemico oltre che nel polmone (tubercolosi miliare polmonare), tubercoli miliarici possono essere presenti

contemporaneamente anche in molti altri organi (tubercolosi miliare sistemica). Sedi preferenziali sono costituite da milza, fegato, meningi. La tubercolosi miliare non è comunque da ritenersi segno di anergia immunologica in quanto le lesioni presentano una buona risposta granulomatosa.

Tubercolosi post-primaria

La tubercolosi post-primaria può derivare sia dalla riattivazione endogena di bacilli tubercolari rimasti vitali nel complesso primario o nei foci periferici raggiunti per via ematogena (nel 5-10% delle infezioni latenti), sia da una reinfezione esogena ad opera di un nuovo ceppo tubercolare (più frequente nei paesi ad alta endemia). Si sviluppa più frequentemente e in modo più severo in giovani e adulti immunocompetenti, probabilmente in seguito a un locale difetto dei macrofagi alveolari che, divenendo schiumosi per l'accumulo di lipidi e perdendo di conseguenza la capacità di uccidere i micobatteri, verrebbero a costituire un santuario per la sopravvivenza e l'aumento esplosivo dei micobatteri.¹⁸

Indipendentemente dalla sede del complesso primario, la tubercolosi post-primaria tende ad avere come prima localizzazione gli apici polmonari, ove vi è ampia produzione di necrosi caseosa. Meno coinvolti sono i linfonodi satelliti. Circa il 90% delle lesioni iniziali regredisce spontaneamente con esiti cicatriziali in sede apicale.

Nel caso in cui la lesione evolva, la necrosi caseosa, talora massiva, va incontro a colliquazione. Il susseguente svuotamento del materiale necrotico per via endobronchiale o per contiguità nel cavo pleurico porta alla formazione di lesioni cavarie (caverne), delimitate da tessuto fibroso e di granulazione e ricche all'interno di bacilli tubercolari in attiva replicazione (figura 9).

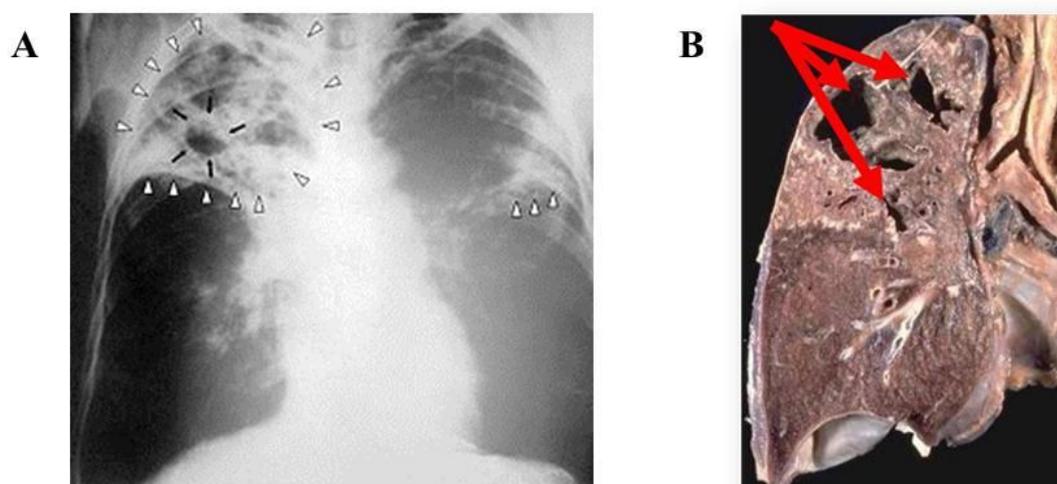


Figura 9 Caverna tubercolare: A) immagine radiologica e B) immagine anatomicopatologica

La formazione di caverne può avere complicanze anche gravi: perdita di aree estese di parenchima polmonare, disseminazione dei bacilli per contiguità o per via endobronchiale, sia al polmone che ad altri organi, quali trachea e laringe e, in seguito a deglutizione dei micobatteri, all'apparato gastrointestinale, erosione dei vasi ematici con emottisi ed emissione di bacilli tubercolari all'esterno attraverso le goccioline di saliva, che costituiscono la fonte diretta di contagio (tubercolosi aperta).¹⁹

La formazione di estese aree di necrosi caseosa, l'evoluzione cavitaria e la tendenza alla localizzazione della tubercolosi post-primaria costituiscono indici di buona risposta immunitaria.

La tubercolosi post-primaria tende a rimanere più localizzata e circoscritta rispetto alla tubercolosi primaria progressiva. Anche nel caso si sviluppino tubercolosi miliari, quest'ultima è più spesso limitata al polmone ed è quindi meno grave e meno diffusa della forma miliare del periodo primario. Tuttavia nella tubercolosi post-primaria vi è comunque immissione di bacilli tubercolari nel circolo sistemico con possibile localizzazione in organi a distanza, quali meningi, encefalo, surrene, rene, ossa, articolazioni, che possono divenire sede di malattia. Il quadro istopatologico presenta, a seconda dello stato immunitario del paziente, lesioni di tipo prevalentemente produttivo o essudativo-necrotico con perdite, anche estese, di parenchima ed esiti e sequele clinicamente differenti a seconda dell'organo interessato.

1.2 Manifestazioni cliniche

Le manifestazioni cliniche assumono nell'ambito di una patologia come la tubercolosi un'importanza del tutto fondata, se si pensa alla lenta crescita del microrganismo responsabile e quindi all'esigenza di avere un primissimo inquadramento diagnostico. L'infezione può portare allo sviluppo della malattia che solitamente colpisce i polmoni (TB polmonare), ma che può interessare anche altri distretti (TB extrapolmonare). Le forme polmonari ed extra-polmonari presentano sintomi diversamente indicativi.

1.2.1 Tubercolosi polmonare

Nonostante la forma iniziale di tubercolosi polmonare sia solitamente asintomatica, spesso è evidenziabile radiologicamente. Dei sintomi sistemici la febbre è il segno più facilmente osservabile, mentre inappetenza, calo ponderale, debolezza, sudorazione notturna e malessere generale appaiono gradualmente. Si tratta purtroppo di segni molto comuni, aspecifici e difficili da correlare alla presenza di malattia tubercolare.

La tosse, che è il sintomo più comune nelle prime fasi della malattia, può essere secca, ma in seguito, quando s'instaurano l'infiammazione e la necrosi tissutale, diventa produttiva. L'emottisi raramente costituisce il sintomo di presentazione della malattia, più spesso è indice di malattia pregressa e non è necessariamente legata a malattia attiva. Il dolore toracico è solitamente dovuto ad una estensione dell'infiammazione polmonare alla parete pleurica. L'anemia normocitica e normocromica è presente in circa il 10% dei casi e nelle forme disseminate. L'ipoalbuminemia e l'ipergammaglobulinemia sono manifestazioni comunemente associate ad una malattia tubercolare avanzata.

In molti pazienti coesistono altre patologie come l'infezione da HIV, alcolismo, insufficienza renale cronica, diabete mellito, malattie neoplastiche, abuso di sostanze stupefacenti; motivo per cui i segni, i sintomi e le complicazioni di queste ultime possono oscurare o modificare quelli della tubercolosi e ritardarne considerevolmente la diagnosi.

La tubercolosi polmonare viene evidenziata precocemente alla radiografia del torace, tuttavia una lesione tubercolare endobronchiale può non essere associata ad alcun segno radiografico.²⁰ La tubercolosi polmonare primaria si evidenzia più frequentemente, nelle zone media e inferiore, come un piccolo infiltrato associato spesso ad adenopatia ilare omolaterale. Se il processo primario progredisce nonostante lo sviluppo dell'immunità cellulo-mediata, aumentano le probabilità che esiti in una lesione cavitaria (tubercolosi primaria progressiva). La tubercolosi polmonare conseguente a riattivazione endogena di infezione latente si evidenzia solitamente mediante alterazioni localizzate all'apice di uno o entrambi i polmoni.

Le caratteristiche radiologiche di una vecchia tubercolosi guarita si differenziano rispetto a quelle della malattia attiva. Le lesioni tubercolari guarite evidenziano cicatrici associate a riduzione del volume del parenchima polmonare e spesso a calcificazione.

1.2.2 Tubercolosi extra-polmonare

La tubercolosi extra-polmonare è solitamente più difficile da diagnosticare rispetto alla tubercolosi polmonare soprattutto perché, essendo meno comune, è meno familiare a molti clinici. In caso di tubercolosi extra-polmonare avremo, oltre ai sintomi sistemici aspecifici, la presenza di sintomi organo-specifici. I distretti più comunemente interessati sono la pleura, i linfonodi, il sistema nervoso centrale, l'apparato osteo-articolare e l'apparato gastroenterico.²¹

Nella **tubercolosi pleurica** due sono i meccanismi mediante i quali lo spazio pleurico viene interessato. Le differenze nella patogenesi determinano diversi quadri clinici, ma anche diversi approcci diagnostici e terapeutici e differenti sequele.

Nella prima varietà di coinvolgimento pleurico in corso di infezione tubercolare pochi bacilli possono crearsi un varco verso lo spazio pleurico. La successiva risposta immunitaria cellulo-mediata provoca una risposta infiammatoria legata ad un fenomeno di ipersensibilità; questo tipo di reazione pleurica non riveste grande importanza clinica e il processo si risolve spontaneamente. In alcuni pazienti, invece, il coinvolgimento pleurico è acuto, accompagnato da febbre e dolore; se il versamento è cospicuo si ha dispnea, tuttavia solitamente il liquido è scarso e raramente bilaterale. In circa il 30% dei casi il parenchima polmonare non è coinvolto.

La seconda varietà di coinvolgimento della pleura è l'empima. Questa è una manifestazione meno comune causata dal travaso di un gran numero di bacilli tubercolari nello spazio pleurico, solitamente dovuto alla rottura di una lesione polmonare cavitaria o proveniente da un focus tubercolare polmonare mediante una fistola bronco-pleurica. L'empima è frequentemente associato a tubercolosi polmonare; nei casi in cui non lo sia si rendono necessarie, per la diagnosi, la toracentesi e la biopsia pleurica, che rappresenta il materiale biologico d'elezione su cui eseguire la diagnosi, ma poiché è di difficile ottenimento, si ricorre solitamente al liquido pleurico.

La **tubercolosi linfonodale** è caratterizzata dalla tumefazione, non dolorosa, di uno o più linfonodi. Solitamente sono coinvolte le catene linfonodali latero-cervicali anteriori e/o posteriori o quelle delle fosse sovra-claveari; frequentemente il processo è bilaterale e possono essere coinvolti anche linfonodi non contigui.

Nelle fasi iniziali la nodulazione è discreta e la cute sovrastante non presenta alterazioni, successivamente le dimensioni del nodulo possono aumentare rendendo evidente una tumefazione sotto la cute notevolmente infiammata. Il linfonodo può colliquare con formazione di un tratto fistoloso a lenta guarigione. La linfadenopatia intratoracica può causare atelettasia da compressione di un bronco. L'agoaspirato o la resezione chirurgica di un linfonodo sono necessari per ottenere materiale diagnostico in caso di normalità della radiografia toracica e in assenza di positività dell'escreato. Sia nei casi di localizzazione periferica che intratoracica delle lesioni linfonodali, le indagini di *imaging* (ecografia, TAC) dimostrano spesso tendenza alla confluenza e alla colliquazione centrale.

La **tubercolosi del sistema nervoso centrale** è la meningite tubercolare ed è il risultato della disseminazione dei micobatteri in corso di una batteriemia tubercolare. Può avvenire in una fase precoce, durante un'infezione tubercolare, od a causa della rottura di un vecchio focolaio parameningeo con disseminazione di micobatteri all'interno dello spazio subaracnoideo.

L'infezione tubercolare meningea è principalmente localizzata a livello della base dell'encefalo; i segni e i sintomi, oltre a quelli correlati all'interessamento dei nervi cranici, sono cefalea, riduzione del livello di coscienza o rigidità nucale. La diagnosi di questa forma viene eseguita su liquido cefalo-rachidiano. Nel 50% dei casi, alla meningite tubercolare si associano alterazioni radiologiche toraciche corrispondenti a vecchi focolai tubercolari od a processi in corso, più spesso miliariformi.

Un'altra forma di tubercolosi del sistema nervoso centrale, anche se non frequente, è il tubercoloma, una lesione occupante spazio, singola o multipla, che di solito causa convulsioni e segni focali. Si presenta come una massa non vascolarizzata circondata da una zona edematosa.

In presenza di segni meningei all'esame fisico, può essere eseguita per scopi diagnostici la puntura lombare. Se si osserva una sintomatologia di tipo focale o si sospetta una aumentata pressione intra-cranica, una TAC o una risonanza magnetica possono aiutare a chiarire il quadro clinico. Comunque, per accertare la diagnosi è necessaria la biopsia.

Nella **tubercolosi osteo-articolare** il sintomo di presentazione è il dolore, spesso associato a tumefazione dell'articolazione coinvolta, a limitazione funzionale e talvolta a fistolizzazione.

Tutti i segmenti ossei possono essere coinvolti, ma è la parte spugnosa dell'osso, maggiormente vascolarizzata, quella prevalentemente interessata. A causa della natura subdola dei sintomi, spesso la diagnosi risulta tardiva con gravi conseguenze, in particolare nella tubercolosi vertebrale, dove le sequele neurologiche della compressione del midollo spinale possono portare anche alla paraplegia. Importante dal punto di vista diagnostico è l'esame radiologico che evidenzia l'erosione ossea, l'osteoporosi subcondrale e l'alterazione dello spazio articolare. In caso di spondilite (morbo di Pott), la TAC e la risonanza magnetica sono molto più sensibili della radiografia convenzionale nell'evidenziare le lesioni della colonna vertebrale. Per l'isolamento microbiologico è necessario ricorrere a biopsie ossee o versamenti di liquido sinoviale.

La **tubercolosi addominale** può interessare tutti gli organi intraddominali nonché il peritoneo; le manifestazioni cliniche sono differenti a seconda delle aree coinvolte.

Più comunemente sono interessati l'ileo terminale ed il cieco. Le manifestazioni cliniche più comuni sono il dolore, che può simulare un'appendicite, e l'oclusione intestinale.

Frequentemente si pone la diagnosi differenziale con il carcinoma; spesso il dubbio viene chiarito solo in sede chirurgica.

Il dolore addominale ed il rigonfiamento dell'addome sono i sintomi di presentazione della peritonite tubercolare. La febbre, la perdita di peso e l'anoressia sono pure comuni.

I sintomi della tubercolosi possono essere coperti dalle malattie concomitanti di cui spesso sono portatori questi pazienti, soprattutto la cirrosi epatica associata ad ascite. La combinazione di febbre e sintomatologia addominale in un soggetto con ascite dovrebbe sempre far sospettare un'infezione intraddominale e suggerire l'esecuzione di paracentesi. Quando quest'ultima non è diagnostica è raccomandata la laparoscopia con biopsia. Campioni di feci, invece, sebbene rappresentino un materiale di facile reperibilità, solo raramente danno luogo a colture positive per micobatteri.

La **tubercolosi disseminata** è conseguente alla inadeguata risposta immunitaria dell'ospite nel controllo dell'infezione tubercolare latente o recentemente acquisita. Con molta probabilità, l'interessamento multiorgano si ha più frequentemente di quanto si creda, anche perché, una volta che il bacillo tubercolare è stato isolato da un campione, non è frequente che vengano valutati anche campioni provenienti da altri siti corporei.

In particolare si definisce miliare la tubercolosi polmonare caratterizzata dal quadro radiografico omonimo, dove il termine miliare è dovuto alla somiglianza delle lesioni con i grani di miglio; tali lesioni sono dei granulomi delle dimensioni di 1-2 mm e possono essere presenti contemporaneamente anche in altri organi.

Le manifestazioni cliniche della tubercolosi disseminata sono molteplici, i segni ed i sintomi sono generalmente aspecifici, in particolare la febbre, il calo ponderale, la sudorazione notturna, l'anoressia e la debolezza; altri sintomi possono dipendere dalla severità della malattia e dagli organi colpiti. La tosse produttiva è comune perché questi pazienti hanno spesso anche un coinvolgimento polmonare. La cefalea associata ad alterazioni dello stato mentale è di solito da imputare alla disseminazione meningea. I segni fisici sono anch'essi variabili, in ordine di frequenza si osservano febbre, dimagrimento, epatomegalia, segni polmonari, linfadenopatia e splenomegalia. Un segno molto suggestivo di disseminazione tubercolare è il riscontro di granulomi a livello della coroide.

La radiologia del torace è anormale nella maggior parte, ma non in tutti i casi di tubercolosi disseminata. Approssimativamente nell'85% dei casi si osserva, al momento della diagnosi, una caratteristica disseminazione miliaria bilaterale che interessa prevalentemente i campi polmonari superiori. Altri riscontri radiografici possono includere infiltrati del lobo superiore con o senza cavitazione, effusione pleurica e pericardica.

1.3 Diagnosi microbiologica

La diagnosi di tubercolosi si basa su criteri microbiologici, radiologici e immunologici, fermo restando che il fondamento principale resta il sospetto clinico. La diagnosi di certezza si basa sull'isolamento culturale di *M. tuberculosis*, che ad oggi rappresenta ancora il *gold standard* nell'iter diagnostico della TB.

1.3.1 Esame microscopico diretto

L'esame microscopico diretto per la ricerca di Bacilli Alcol-Acido Resistenti (BAAR) mediante colorazione di Ziehl-Neelsen o immunofluorescenza con auramina e rodamina è il metodo più rapido ed economico utilizzato per la diagnosi di tubercolosi. Può essere eseguito direttamente da qualsiasi materiale biologico, escluso il sangue, dove in genere la carica microbica è troppo bassa per poter essere rilevata. Per valutare pazienti con sospetta TB polmonare, l'esame può essere eseguito su espettorato o espettorato indotto (mediante aerosol di soluzione salina ipertonica), sul liquido di lavaggio bronco-alveolare o su broncoaspirato. In caso di TB extra-polmonare il materiale biologico da raccogliere dipende dalla localizzazione sospetta.

All'esame microscopico i micobatteri appaiono come sottili bacilli di colore fucsia (figura 10).

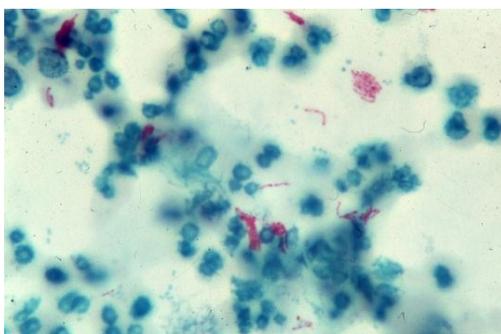


Figura 10 Immagine microscopica di bacilli alcol-acido resistenti in uno striscio di espettorato sottoposto a colorazione di Ziehl-Neelsen

Fornisce un risultato quantitativo in tempi rapidi, ed è utile per stimare la contagiosità del paziente. La carica batterica viene espressa in base al numero di BAAR osservati per campo ottico in base alla classificazione secondo Le Minor e Véron (tabella 1).

	CLASSE
Negativo	-
1-2 BAAR/vetrino	Rari
< 10 BAAR/100 campi	+
1-10 BAAR/10 campi	++
1-10 BAAR/campo	+++
10-100 BAAR/campo	++++

Tabella 1 Tabella per l'interpretazione quantitativa dell'esame microscopico per Bacilli Alcol-Acido Resistenti secondo Le Minor e Veron

I limiti principali di questo test sono la scarsa sensibilità (tra il 22% e il 78%), l'alto limite di rilevazione poiché risulta positivo solo in presenza di un numero elevato di micobatteri (5000-10000/ml) e la scarsa specificità (le proprietà tintoriali dei micobatteri sono comuni anche ad altri microrganismi); inoltre questo è un esame operatore dipendente

Per aumentare la sensibilità può essere eseguito in seguito a concentrazione mediante centrifugazione del campione. Una raccolta seriale di campioni, sia in fase diagnostica che durante il trattamento, permette una maggiore probabilità di diagnosi e il monitoraggio dell'efficacia della terapia.

1.3.2 Esame colturale

L'isolamento colturale del bacillo tubercolare rimane a tutt'oggi il *gold standard* nella diagnosi di laboratorio di tubercolosi. E' molto più sensibile dell'esame microscopico diretto e permette inoltre di effettuare test di sensibilità ai farmaci e genotipizzazione.

I micobatteri sono caratterizzati da tempi di crescita in vitro molto lenti, soprattutto in rapporto ai tempi di crescita di molti altri batteri. Per questo motivo il campione biologico deve essere trattato con reagenti decontaminanti prima della semina su terreno, affinché la carica microbica contaminante non interferisca con la crescita dei micobatteri. Campioni provenienti da siti sterili, come sangue e liquor cefalorachidiano, non necessitano di decontaminazione. I materiali respiratori necessitano inoltre della fluidificazione.

Per la decontaminazione possono essere usati diversi metodi, tra cui il più utilizzato è quello che utilizza N-Acetil-L-Cisteina (NALC) come fluidificante e idrossido di sodio (NaOH) come decontaminante.

Attualmente, gli standard internazionali prevedono l'uso di due terreni di coltura, terreno solido e terreno liquido (figura 11).

I terreni solidi possono essere a base di uovo (Lowenstein-Jensen, Petriagnani) o di agar (Middlebrook 7H10). La crescita avviene a temperature comprese tra 35 e 37°C, e in genere necessita di almeno 3 settimane.

L'introduzione di terreni liquidi ha permesso un rilevamento più sensibile e precoce della crescita micobatterica. Negli ultimi anni sono stati introdotti sistemi automatizzati, come il sistema BACTEC MGIT 960 (Becton-Dickinson, USA). Questo sistema utilizza provette di plastica contenenti brodo Middlebrook 7H9 modificato, che viene poi addizionato con il supplemento di crescita OADC per l'arricchimento (a base di acido oleico, albumina bovina, destrosio e catalasi) e una miscela di antibiotici (Polimixina B, Anfotericina B, Acido Nalidixico, Trimethoprim, Azlocillina; PANTA); alla base della provetta è adeso un fluorocromo sensibile alle variazioni di ossigeno. Il consumo di ossigeno conseguente alla crescita batterica provoca un aumento della fluorescenza che viene rilevata dallo strumento (letture ogni 60 minuti). La crescita può essere rilevata già entro una settimana. Questo sistema può essere impiegato anche per l'esecuzione di test di sensibilità ai farmaci.²²

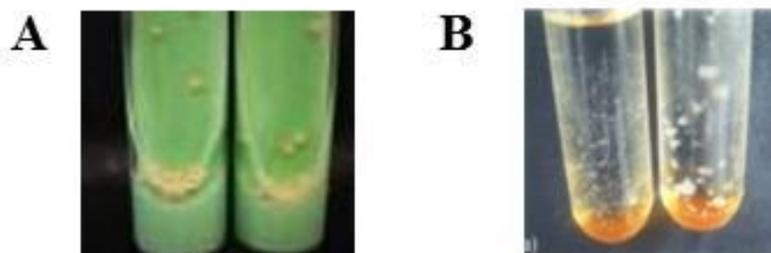


Figura 11 Aspetto delle colonie di *M. tuberculosis* cresciute A) su terreno solido Lowenstein-Jensen e B) in terreno liquido MGIT

1.3.3 Tecniche molecolari

La necessità di disporre di un test rapido per la diagnosi di tubercolosi ha portato allo sviluppo delle tecniche di amplificazione genica per la ricerca del *Mycobacterium tuberculosis complex* direttamente da campioni clinici. Esse permettono di rilevare sequenze geniche specifiche mediante la loro amplificazione. Nella ricerca del bacillo tubercolare, le sequenze target più usate sono IS986 e IS6110.

Un grande passo avanti è stata l'introduzione del GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, USA), una piattaforma automatizzata in cui l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione mediante una Real time PCR *semi-nested* si realizzano all'interno di una cartuccia monouso.²³ Il test è in grado di rilevare direttamente da campioni clinici e in modo semi-quantitativo contemporaneamente la presenza del DNA di *M. tuberculosis* e l'eventuale presenza di mutazioni associate alla resistenza alla Rifampicina. I primer amplificano una sequenza di 81 pb localizzata nella regione *core* del gene *rpoB*, definita RRDR (*Rifampin Resistance-Determining Region*) dove è concentrato il 95% delle mutazioni che inducono resistenza alla Rifampicina. L'amplificato prodotto viene rilevato in seguito all'ibridazione con sonde *molecular beacon* che riconoscono vari frammenti della sequenza *wild-type* (figura 12). L'assenza del segnale dovuta al *mismatch* di almeno una sonda indica la presenza di mutazioni nella sequenza di *rpoB*, come marker surrogato di TB MDR.

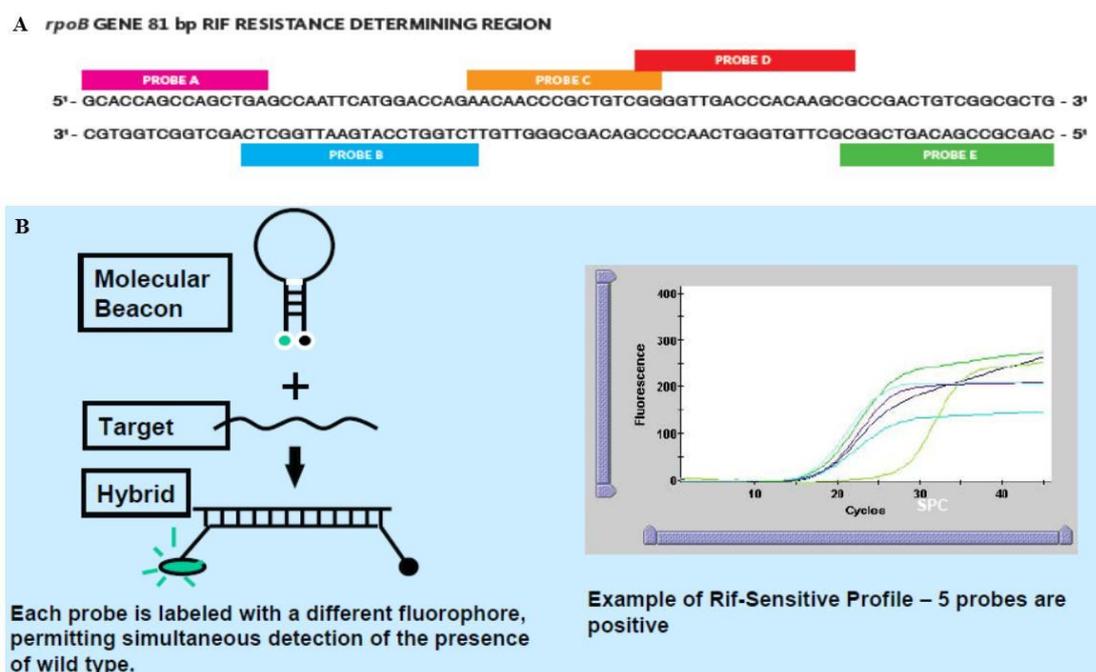


Figura 12 Principio del test GeneXpert MTB/RIF: A) sonde nella regione del gene *rpoB*, B) sonde *molecular beacon* e loro profilo di amplificazione

Il sistema GeneXpert offre molteplici vantaggi: è rapido poiché fornisce un risultato in 2 ore, riduce il rischio di cross-contaminazioni poiché ogni cartuccia è dedicata per un campione e non richiede particolare formazione in biologia molecolare.

I dati di letteratura su GeneXpert MTB/RIF sono ormai numerosi e mostrano la buona performance del test sia su campioni respiratori, per i quali è stato validato dal produttore, con sensibilità e specificità rispettivamente del 93,8% e 98,8%, che su

quelli extrapolmonari (sensibilità 79%, specificità 97,3%), con una particolare nota di merito per alcuni materiali notoriamente ostici, quali liquido cefalo rachidiano, urine ed aspirato gastrico.^{24,25} Nella maggior parte dei lavori pubblicati, i dati sulla *detection* della resistenza alla Rifampicina non sono valutabili per la presenza a causa del numero ridotto di ceppi resistenti. Nei tre studi condotti su un numero di ceppi sufficientemente elevato, i dati di sensibilità e specificità per la rilevazione della resistenza alla Rifampicina si sono dimostrati molto buoni oscillando rispettivamente fra il 94,4% ed il 99% e fra il 98,3% ed il 100%.²⁶

In virtù della semplicità operativa, il GeneXpert MTB/RIF è particolarmente adatto per i Paesi in via di sviluppo dove spesso mancano le infrastrutture e le conoscenze indispensabili per l'utilizzo dei tradizionali test di biologia molecolare. L'OMS, ben comprendendo l'enorme vantaggio che il test può offrire in tali setting nella lotta contro la tubercolosi, lo ha adottato ufficialmente nel 2010 e ne sostiene l'implementazione su larga scala.^{27,28}

1.4 Diagnosi immunologica

1.4.1 Test Cutaneo Tubercolinico

Il test cutaneo tubercolinico, eseguito mediante l'intradermoreazione secondo Mantoux (TCT), è stato introdotto nella pratica clinica nel 1890. Essa valuta la risposta immunitaria cellulo-mediata (ipersensibilità di tipo ritardato) al Derivato Proteico Purificato (PPD), un cocktail di antigeni micobatterici estratti da *M. tuberculosis*.²⁹

Il test viene eseguito iniettando 5 U di PPD per via intradermica nella superficie volare dell'avambraccio (figura 13). Dopo 48-72 ore si esegue la lettura; l'intensità della risposta immune al test viene determinata misurando il diametro dell'infiltrato (solo la parte indurita, non quella eritematosa). Il risultato deve essere espresso in millimetri e la reazione si considera positiva se l'infiltrato misura almeno 10 mm di diametro (5 mm nei pazienti immunocompromessi).

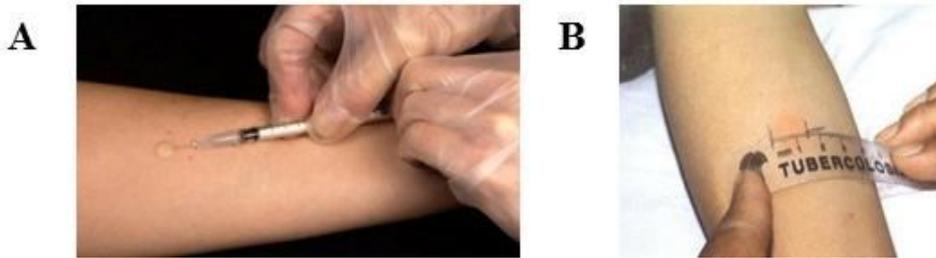


Figura 13 Esecuzione del test cutaneo della tubercolina A) mediante intradermoreazione secondo Mantoux e B) sua lettura

Il TCT ha una bassa specificità nelle popolazioni ad alta copertura vaccinale e in quelle in cui è frequente l'esposizione a micobatteri non tubercolari poichè gli antigeni che costituiscono il PPD sono comuni a diverse specie di micobatteri non tubercolari e al ceppo vaccinale BCG.³⁰⁻³² Anche la sensibilità è bassa, soprattutto in presenza di condizioni che causano un deficit immunitario.³³

1.4.2 Test IGRA (*Interferon- γ Release Assay*): T-SPOT.TB e Quantiferon-TB Gold In-Tube

I test IGRA (*Interferon- γ Release Assay*) sono ampiamente utilizzati per la diagnosi di ITBL dal 2001 e sono diventati utili test di supporto per la diagnosi di TB attiva negli adulti.^{34,35} Sono test immunologici basati sulla misurazione del rilascio di Interferon- γ (IFN- γ) da parte dei linfociti T effettori di memoria, in presenza di antigeni specifici di *M. tuberculosis* verso i quali i linfociti sono stati precedentemente sensibilizzati. Una risposta dei linfociti alla stimolazione con antigeni tubercolari presuppone quindi un precedente contatto con il micobatterio. Gli antigeni utilizzati nei test commerciali sono ESAT-6 (*Early Secretory Antigen Target-6*) e CFP-10 (*Culture Filtrate Protein-10*), codificati da geni localizzati nella *Region of Difference-1* (RD-1) di *M. tuberculosis*.

I test IGRA ricalcano *in vitro* il meccanismo che avviene in vivo in seguito alla intradermoreazione del PPD (figura 14); tuttavia presentano numerosi vantaggi rispetto al TCT.³⁶⁻³⁸ Gli antigeni impiegati nei test IGRA sono più specifici rispetto al PPD, in quanto non sono presenti nel ceppo BCG né nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari. Inoltre la lettura dei test IGRA è oggettiva e richiede solo la stimolazione *over-night* dei linfociti, diversamente dalla lettura soggettiva a 72 ore dall'intradermoreazione per il TCT. Sebbene siano più costosi la loro applicazione si sta diffondendo, soprattutto in alcune popolazioni ad elevato rischio di infezione tubercolare e progressione a malattia attiva, quali i trapiantati e i pazienti sottoposti a terapie biologiche.

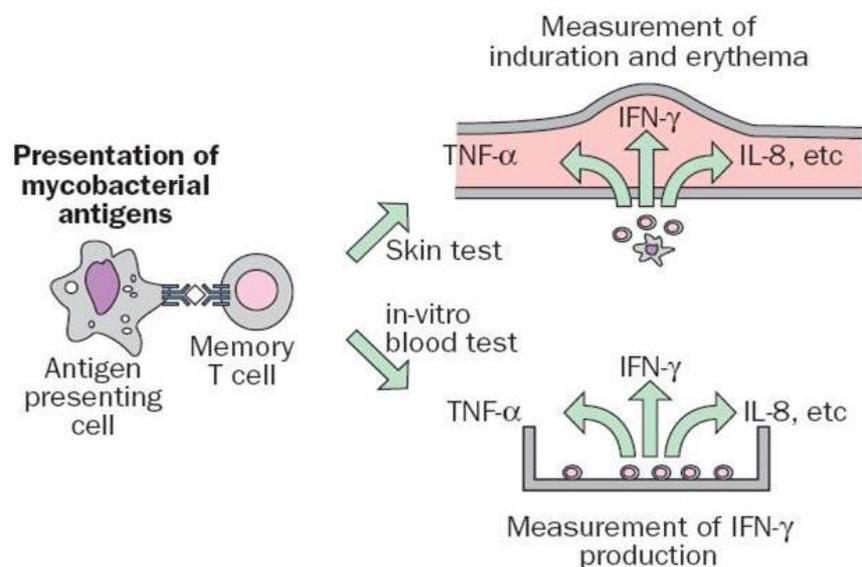


Figura 14 Rappresentazione schematica dei principi alla base del Test Cutaneo Tubercolinico e del test IGRA a confronto

I due test IGRA attualmente disponibili in commercio sono: il Quantiferon-TB Gold In-Tube (QFT-IT) (Cellestis, Qiagen, Germania) e il Test T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Gran Bretagna).

T-SPOT.TB

Questo test viene eseguito usando cellule mononucleate purificate, isolate da un campione di sangue periferico. La stimolazione antigenica è eseguita su piastra mediante i peptidi ESAT-6 e CFP-10, a cui un numero prefissato di cellule viene esposto per 16-24 ore a 37°C. Il test dispone di un controllo negativo, rappresentato dalle cellule in assenza di alcun stimolo, e di uno positivo, rappresentato da uno stimolo aspecifico delle cellule T, la Fitoemoagglutinina (PHA). La produzione di IFN- γ viene analizzata con la tecnica ELISPOT (*Enzyme Linked-Immuno Spot*), che consente di rilevare ogni singolo linfocita che produce la citochina.³⁹

Quantiferon-TB Gold In-Tube

Il QFT-IT è un test che può essere utilizzato per la rivelazione sia di infezione tubercolare latente che di malattia tubercolare.

Il test viene eseguito direttamente su sangue venoso intero e la stimolazione antigenica, che si basa sui peptidi ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 (appartenente sempre alla regione RD1 di MTB), avviene direttamente nelle provette di prelievo.

Questo sistema prevede la raccolta di 1 ml di sangue in ciascuna delle 3 provette dedicate (figura 15):

- Nil: controllo negativo, per la misurazione del rumore di fondo, dovuto ad anticorpi eterofili o alla presenza di IFN- γ non specifico nel campione;
- TB Antigen: contenente una miscela degli antigeni ESAT-6, CFP-10 e TB7.7;
- Mitogeno: controllo positivo, contenente Fitoemoagglutinina per la stimolazione aspecifica dei linfociti al fine di monitorare la reattività del sistema immunitario del paziente. Qualora questo controllo non sia soddisfatto, il test risulta indeterminato per quanto riguarda la risposta agli antigeni di MTB e lo stato di infezione non può essere definito.



Figura 15 Componenti del test Quantiferon-TB Gold In-Tube

Una volta prelevato il sangue, le provette vengono miscelate ed incubate per 16-24 ore a 37°C. La concentrazione di IFN- γ prodotto viene determinata utilizzando la tecnica ELISA (*Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay*). Sottraendo la quantità di IFN- γ della provetta del controllo negativo dalla quantità di IFN- γ delle provette contenenti gli antigeni specifici di MTB e il Mitogeno, si determina la quantità netta di IFN- γ secreto in risposta alla stimolazione antigenica specifica e al Mitogeno.⁴⁰

Nel complesso, gli IGRA sono più specifici del TCT (99,4% rispetto a 88,7%) per la diagnosi di tubercolosi latente. Sebbene la mancanza di un *gold standard* per la diagnosi di ITBL non permetta di determinare l'accuratezza diagnostica sia degli IGRA che del TCT, un'alternativa per valutare la loro sensibilità è il confronto del rischio di sviluppare la TB attiva in soggetti con un aumentato rischio di progressione da ITBL di malattia attiva. Nella metanalisi condotta da Diel e collaboratori gli IGRA

si sono dimostrati correlare meglio con l'esposizione a casi di TB attiva, perfino nei pazienti immunocompromessi.^{41,42}

In letteratura sono presenti numerosi studi di meta-analisi che valutano il ruolo degli IGRA anche nella diagnosi di tubercolosi attiva.^{43,44} I risultati variano molto in base all'incidenza della TB nelle diverse aree geografiche e alle caratteristiche della popolazione (HIV, età, ..). Recenti metanalisi sulle performance del test QFT-IT per la diagnosi di TB hanno rilevato una sensibilità totale dell'80%, che tende a diminuire negli HIV-positivi e nei bambini, e una specificità totale del 79%.^{45,46} Dato che il QFT-IT non discrimina tra tubercolosi attiva e latente, si può affermare che la sua specificità nei confronti dell'infezione attiva potrebbe essere alta in popolazioni in cui l'infezione latente è poco frequente. L'utilità del test è molto limitata invece in popolazioni con alta prevalenza di ITBL: in questo caso un alto valore predittivo negativo potrebbe aiutare nella diagnosi di esclusione.^{40,47}

1.5 Tubercolosi in età pediatrica

1.5.1 Epidemiologia della tubercolosi pediatrica

Negli ultimi decenni la tubercolosi è emersa come emergenza anche nella popolazione pediatrica. Rispetto all'anno 2014 l'OMS ha riportato 1 milione di nuovi casi di TB, corrispondenti all'11% dei casi totali riscontrati a livello mondiale, e 140000 decessi a carico di bambini minori di 15 anni. La TB pediatrica contribuisce al 3-6% dei casi totali di TB nei Paesi sviluppati e ad oltre il 25% nei Paesi in via di sviluppo.¹

Nell'Unione europea sono stati registrati 2258 casi di TB pediatrica nel 2014, corrispondenti al 3,9% dei casi totali europei, con un tasso di incidenza di 2,8 casi/100000 abitanti.²

Tuttavia i metodi di stima attualmente in uso soffrono di alcune limitazioni, tra cui la diagnosi errata a causa delle difficoltà nel diagnosticare la TB in età pediatrica, la sotto-stima delle segnalazioni dei casi pediatrici e la mancanza di dati epidemiologici disaggregati per età.

L'ultimo dato relativo alla situazione della TB pediatrica in Italia riportava 124 casi di TB attiva notificati nei bambini da 0 a 14 anni nel 2013. Recentemente, Galli e collaboratori hanno prodotto il primo registro nazionale italiano della TB pediatrica, da cui è emerso che una più alta percentuale di bambini italiani è colpita da TB attiva rispetto alla TB latente e che il 7% delle TB attive nei bambini è causato da ceppi di *M. tuberculosis* farmaco-resistente.⁴⁸

Inoltre, secondo l'indagine di sorveglianza condotta da Odone e collaboratori in Emilia-Romagna,⁴⁹ setting di questo studio, la più alta incidenza di tubercolosi pediatrica (44,4%) è stata riscontrata nei bambini nati in Italia da famiglia immigrata, come conseguenza dell'esposizione di bambini non vaccinati ad adulti con un alto rischio di avere la tubercolosi, che spesso vivono in condizioni precarie o viaggiano in Paesi ad alta incidenza tubercolare.

La TB pediatrica può essere considerata una sentinella della diffusione della malattia nella comunità.⁵⁰ Inoltre, i bambini sono particolarmente a rischio di progressione verso forme di malattia attiva gravi e perfino mortali, e quelli con una infezione latente rappresentano un serbatoio potenziale di riattivazione della malattia in età adulta. Di conseguenza, la TB pediatrica necessita di un'identificazione tempestiva e un miglioramento della sorveglianza della tubercolosi è importante per gli operatori sanitari e i pediatri per raggiungere una migliore conoscenza degli aspetti clinici distintivi della TB nei pazienti pediatrici, spesso diagnosticata in ritardo per mancanza di un sospetto epidemiologico.

Dal punto di vista terapeutico la mancanza di protocolli standardizzati per la terapia della TB pediatrica, anche farmaco-resistente, impone l'impostazione di regimi di trattamento spesso empirici o basati su modelli di sensibilità e gravità della malattia. Non di meno, i farmaci usati nei pazienti pediatrici sono spesso utilizzati *off-label*, quando non limitati dalla mancanza di una vera e propria formulazione pediatrica.⁵¹

1.5.2 Diagnosi della tubercolosi pediatrica

Dal punto di vista diagnostico la TB pediatrica è stata relativamente trascurata per diversi anni, principalmente per le difficoltà che accompagnano l'isolamento di *M. tuberculosis* nei bambini.

La diagnosi di TB attiva nei bambini è complicata da vari fattori: i test diagnostici per la conferma microbiologica della malattia attiva sono meno sensibili rispetto agli adulti, i bambini hanno una presentazione clinica aspecifica, con meno cavitazioni e un minor numero di bacilli, e sono più suscettibili ad avere una localizzazione extra-polmonare rispetto agli adulti.^{52,53}

Recentemente, la definizione di un'adeguata gestione della TB nei bambini è diventata uno dei principali aspetti dei programmi di controllo globale della TB e sono stati ottenuti nuovi sviluppi nella diagnosi e nel trattamento della TB pediatrica.

Attualmente le linee guida raccomandano di applicare ai pazienti pediatrici una combinazione dei diversi approcci disponibili, clinici, radiologici, immunologici e microbiologici, per aumentare la resa diagnostica.^{54,55}

Dal punto di vista microbiologico, è stato suggerito un approccio diagnostico basato sul *multiple sampling*, che consiste nella raccolta seriale di materiali biologici provenienti da diversi distretti corporei in base alla sospetta localizzazione. Campioni biologici consecutivi possono essere raccolti dal tratto respiratorio, quali aspirati di succo gastrico, aspirati faringo-nasali, espettorati (nei bambini più grandi e negli adolescenti), o da siti extra-polmonari, come aspirati linfonodali, biopsie, liquido cefalo-rachidiano e urine.^{56,57}

Data la natura pauci-bacillare dei campioni prelevati dai pazienti pediatrici, la metodica di indagine microbiologica che può assicurare maggiore sensibilità, è rappresentata dalle tecniche di biologia molecolare. A tal fine, le performance del test GeneXpert si sono rivelate buone anche nei campioni provenienti da pazienti pediatrici con sensibilità dell'86.9% e specificità del 99.7%.^{25,58}

Sono stati suggeriti anche approcci molecolari alternativi, ad esempio basati sulla ricerca di piccoli DNA di MTB prodotti in seguito all'apoptosi delle cellule infette e di una dimensione tale (< 200 bp) da attraversare la barriera glomerulare; è perciò possibile rilevarli nelle urine tramite tecniche di amplificazione degli acidi nucleici e utilizzarli a scopi diagnostici, prendendo il nome di DNA transrenale (Tr-DNA).^{59,60}

La possibilità di identificare nelle urine la presenza di specifiche sequenze di MTB (Tr-MTB-DNA) appare molto interessante per la facile reperibilità e la poca invasività di questi materiali biologici, soprattutto in quei casi dove la conferma microbiologica risulta più difficoltosa come nei pazienti pediatrici

Poiché dopo l'esposizione ad un caso di TB attiva, i bambini sono a più alto rischio di progredire a malattia rispetto agli adulti, lo screening dei contatti, l'identificazione e la chemioprophilassi delle infezioni latenti diventano obbligatori. Tuttavia, la mancanza di un *gold standard* di infezione tubercolare rende questa analisi difficile.

Ad oggi, le performance del Test Cutaneo Tubercolinico e del test Quantiferon-TB Gold In-Tube nell'identificazione di soggetti con ITBL non sono ancora state completamente descritte in età pediatrica e, in particolare, nella fascia d'età sotto i 5 anni. Fino a poco tempo fa, il TCT rappresentava il metodo diagnostico principale per rilevare l'ITBL anche nei bambini, seppure accompagnato da diverse limitazioni. La sensibilità del TCT può essere influenzata dall'età e dallo stato immunologico del bambino, che possono portare a risultati falsi negativi, mentre la specificità subisce la cross-reazione con la vaccinazione con BCG e con precedenti infezioni da micobatteri non-tubercolari, che possono portare a esiti falsamente positivi.^{30,31}

Nonostante il crescente numero di studi al riguardo, l'accuratezza diagnostica degli IGRA nei bambini resta ancora controversa, soprattutto a causa del loro sistema immunitario immaturo e delle percentuali variabili di risultati indeterminati.⁶¹⁻⁶⁶

Restano comunque dubbie le performance del test nei bambini più piccoli, in particolare sotto i 2 anni, a causa dell'alto numero di risultati indeterminati in questa popolazione e all'alta variabilità di risultati nei diversi studi.⁶⁷

Uno studio multicentrico italiano condotto su bambini sotto i 2 anni ha riportato una sensibilità del test QFT-IT del 92,4% per la diagnosi di TB attiva,⁶⁸ mentre Chiappini e collaboratori hanno evidenziato una sensibilità del 73,3% in bambini sotto i 5 anni.⁶⁵

Il recente studio di Sali riporta dei dati incoraggianti, con una sensibilità complessiva dell'87,5%, che varia dal 62,5% nei bambini sotto i 3 anni al 100% in quelli sopra i 4 anni.⁶⁹ Inoltre, la percentuale di indeterminati è bassa (4,2%); in quasi tutti i casi è stata riscontrata una concomitante infezione batterica o virale, e in 2 casi una TB attiva in stadio iniziale. Questo porta a concludere che la giovane età non può essere considerata l'unica causa di un risultato indeterminato.

In conclusione, le evidenze ad oggi disponibili non supportano ancora l'utilizzo degli IGRA come alternativa al TCT; tuttavia, diverse linee guida nazionali prevedono l'uso degli IGRA, in combinazione con il TCT, negli algoritmi di screening per ITBL.^{55,70,71}

2 Scopo della tesi

La diagnosi microbiologica di tubercolosi (TB) nei pazienti pediatrici può risultare lunga e difficoltosa e attualmente l'utilità dei test immunologici basati sul rilascio di IFN- γ , quale il Quantiferon-TB Gold In-Tube (QFT-IT) utilizzato in questo studio, è ancora oggetto di dibattito.

Scopo principale dello studio è stato la valutazione delle performance diagnostiche del test QFT-IT come ausilio nella diagnosi di tubercolosi in un'ampia coorte di bambini sottoposti a screening per infezione tubercolare in un'area italiana a bassa incidenza di TB, ma con alti flussi migratori.

I risultati qualitativi del test QFT-IT sono stati confrontati con quelli ottenuti dal Test Cutaneo Tubercolinico (TCT) al fine di valutare la concordanza tra i due test attualmente in uso, rispetto a criteri quali il Paese di origine, la vaccinazione con BCG, il motivo dello screening, la diagnosi e l'età.

Un ulteriore obiettivo è stato la valutazione della sensibilità del QFT-IT nella diagnosi di TB attiva nella popolazione pediatrica sintomatica, in confronto con il TCT.

Inoltre, è stata eseguita un'analisi quantitativa dei valori di IFN- γ in risposta agli stimoli presenti nel QFT-IT, al fine di evidenziare una correlazione tra i risultati del test in funzione della diagnosi e dell'età dei pazienti pediatrici.

3 Materiali e metodi

3.1 Popolazione in studio

E' stato effettuato uno studio retrospettivo della durata di 5 anni analizzando una popolazione di 517 bambini di età compresa tra 0 e 16 anni valutati presso l'Unità di Pediatria del Policlinico Universitario S. Orsola-Malpighi di Bologna, un'area italiana a bassa incidenza di tubercolosi, ma con alti tassi di immigrazione da Paesi a media/alta prevalenza tubercolare.

Il criterio di inclusione era aver eseguito un test QFT-IT per sospetto clinico di TB attiva, durante lo screening dei contatti di un caso di TB attiva o per la recente immigrazione (da meno di 6 mesi) da Paesi endemici per TB e nello screening di routine prima dell'inizio di una terapia immunosoppressiva.

Come controlli negativi sono stati inclusi 30 bambini sottoposti al test QFT-IT durante l'esecuzione di un prelievo ematico per altri motivi non legati al sospetto di malattie infettive o a condizioni immunosoppressive, dopo aver ottenuto il consenso informato nel corso di un studio prospettico sul test QFT-IT. I controlli negativi non sono stati testati con il TCT.

Per ogni paziente sono stati raccolti dati di carattere demografico (sesso, luogo di nascita, origine della famiglia, età al momento della diagnosi, stato vaccinale), clinico (motivo dello screening, localizzazione polmonare o extra-polmonare della TB, risultato del TCT) e microbiologico (esame microscopico e colturale, risultato del test GeneXpert MTB/RIF, risultato del test QFT-IT).

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico Indipendente del Policlinico Universitario S. Orsola-Malpighi.

3.2 Diagnosi microbiologica

In caso di sospetto di TB attiva, è stato adottato un approccio di campionamento multiplo di materiali biologici.⁵⁶ Sono stati raccolti campioni biologici consecutivi provenienti dalle vie respiratorie (espettorato, succo gastrico, aspirato faringo-nasale) e da siti extra-polmonari (aspirati linfonodali, urine).

3.2.1 Esame microscopico

Il vetrino allestito con uno striscio diretto del campione biologico è stato sottoposto alla colorazione di Ziehl-Neelsen che consente di evidenziare la presenza di Bacilli Alcol-Acido Resistenti all'osservazione microscopica.

Colorazione di Ziehl-Neelsen

- Trattare il preparato, precedentemente fissato al calore, con fucsina fenica (carbolfucsina) riscaldando il vetrino fino a quando dalla soluzione colorante non fuoriescono vapori visibili;
- lavare con acqua corrente e decolorare per 30-60 sec. con una soluzione di HCl al 3% in alcol etilico;
- lavare nuovamente con acqua corrente ed effettuare una colorazione di contrasto con blu di metilene;
- dopo circa 2 minuti lavare ancora con acqua corrente e lasciare asciugare i vetrini all'aria.

In questo modo, attraverso la lettura al microscopio ottico con obiettivo 100X ad immersione, sono facilmente apprezzabili i micobatteri come bacilli rossi in campo blu, ed in base al loro numero viene interpretato l'esame.

3.2.2 Esame colturale

L'isolamento di micobatteri da materiali biologici è possibile solo a condizione che essi si trovino in campioni puri (condizione limitata solo a materiali particolari quali liquor, sangue e liquidi cavitari, normalmente sterili), oppure che vengano ricondotti a tale condizione artificialmente, mediante decontaminazione. È inoltre opportuno che i campioni risultati positivi all'esame microscopico siano trattati per ultimi nell'esecuzione dell'esame colturale per evitare contaminazioni.

Esistono vari tipi di decontaminanti, ma la decontaminazione con N-Acetil-L-Cisteina (NALC) può essere ritenuto il metodo di riferimento per la coltura dei micobatteri. Esso è costituito da una miscela decontaminante-fluidificante contenente in parti uguali citrato trisodico tri-idrato al 2,94 % e NaOH al 4 %, alla quale deve essere aggiunta al momento dell'uso N-Acetil-L Cisteina in polvere allo 0,5 %. La concentrazione finale di NaOH risulta quindi dell'1 %, essendo dimezzata una prima volta dall'aggiunta del tampone e una seconda volta dall'aggiunta del campione. La NALC agisce riducendo i ponti disolfuro a radicali -SH, inibendo così lo sviluppo di altri batteri e lieviti eventualmente presenti.

Procedura di decontaminazione

- Aggiungere la soluzione decontaminante, BBL MycoPrep (Becton-Dickinson, USA), appena preparata in rapporto 1:1 con il campione. Vortexare sotto cappa per 5-10 secondi, far agire il decontaminante lasciando i campioni per 23 minuti a temperatura ambiente;
- arrestare la reazione aggiungendo il tampone fosfato sterile (pH 6,8) fino ad un volume finale di 50 ml e mescolare;
- centrifugare per 15 minuti a 3000 rpm;
- decantare immediatamente tutto il sovrantante, scartando nell'apposito contenitore sotto cappa;
- risospendere il sedimento aggiungendo 1-2 ml di tampone fosfato, vortexare e procedere alla semina.

Semina su terreni di coltura solidi

I campioni vengono seminati in tubi di terreno solido Lowenstein-Jensen a base di tuorlo d'uovo e verde di malachite e tubi Lowenstein-Jensen antibiotati (Biolife, Italia), quest'ultimi più selettivi perché addizionati della miscela antibiotica PACT (Polimixina B, Anfotericina, Carbanecillina e Trimethoprim).

- con una siringa sterile prelevare 500 µl di campione precedentemente decontaminato e inocularne 250 µl nel tubo di terreno Lowenstein-Jensen e 250 µl nel tubo di terreno Lowenstein-Jensen antibiotato;
- alloggiare i tubi negli appositi sostegni inclinati nell'incubatore a 37°C, lasciando il tappo allentato per permettere l'evaporazione dell'acqua in eccesso;
- dopo circa una settimana di incubazione avvitare a fondo il tappo dei tubi; nel periodo successivo ispezionare le colture una volta alla settimana, per rilevare eventuali positività e contaminazioni.

Semina su terreni di coltura solidi

Il sistema di crescita utilizzato in questo studio per le colture su terreno liquido è il MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*, Becton-Dickinson, USA). Il terreno, un brodo Middlebrook 7H9 modificato, è contenuto in una provetta circolare sul fondo della quale, all'interno di un film di silicone, è presente un composto fluorescente. Tale composto è sensibile alla presenza di ossigeno sciolto nel brodo e per questo funge da sistema rivelatore, in quanto caratteristica metabolica dei micobatteri è proprio l'elevato consumo di ossigeno e la scarsa produzione di anidride carbonica. Lo sviluppo di fluorescenza viene rilevato in maniera del tutto automatizzata dallo strumento in cui vengono messi ad incubare i tubi.⁷²

- aggiungere ad ogni provetta MGIT 800 µl di supplemento di crescita OADC, a base di acido oleico, albumina bovina, destrosio e catalasi, addizionato con la miscela antibiotica PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Acido Nalidixico, Trimethoprim, Azlocillina);
- inoculare con una Pasteur 500 µl di campione precedentemente decontaminato;
- incubare nello strumento MGIT.

Lo strumento esegue automaticamente ogni 60 minuti la lettura della fluorescenza per rilevarne eventuali aumenti. Le provette che non danno alcun segnale di fluorescenza dopo i 42 giorni di durata del protocollo sono considerate negative, mentre quelle in cui vengono rilevate già dopo 4 giorni tra 10^5 e 10^6 circa di Unità Formanti Colonie per millilitro (UFC/ml) sono considerate positive.

3.2.3 Test di sensibilità ai farmaci anti-tubercolari

Il test di sensibilità ai farmaci anti-tubercolari deve essere eseguito su tutti i ceppi di primo isolamento e deve essere ripetuto se il paziente continua a produrre campioni positivi all'esame colturale dopo due o tre mesi di trattamento o se le colture tornano a positivizzarsi dopo un periodo di risultati colturali negativi.

Devono essere testati i farmaci di prima scelta, costituiti da Etambutolo, Isoniazide, Rifampicina e Pirazinamide. La collocazione della Streptomicina, considerata fino a qualche anno fa antibiotico di prima linea, è oggi controversa, essendo stata declassata a farmaco di seconda scelta dai CDC, ma non dall'OMS. Il suo inserimento nell'antibiogramma ha quindi un senso solo per i laboratori a cui afferiscono reparti che includono la streptomicina nel loro protocollo terapeutico.^{1,2}

Partendo da una coltura pura di micobatteri tubercolari si utilizza lo strumento BACTEC MGIT 960 per rilevare l'eventuale crescita in presenza di farmaci anti-tubercolari di prima linea (SIRE e PZA) alle seguenti concentrazioni critiche: Streptomicina 1,0 µg/ml, Isoniazide 0,1 µg/ml, Rifampicina 1,0 µg/ml, Etambutolo 5,0 µg/ml e Pirazinamide 100 µg/ml. In presenza di resistenze a Isoniazide, Etambutolo e Streptomicina è possibile eseguire un secondo test utilizzando le concentrazioni più elevate: Isoniazide 0,4 µg/ml, Etambutolo 7,5 µg/ml, Streptomicina 4,0 µg/ml.

- Preparare 5 provette MGIT per ogni campione da testare, contrassegnarne una come GC=controllo di crescita, una come STR, una INH, una RIF e una EMB, collocarle nell'apposito rack, nella sequenza corretta, impostata nel software dello strumento;
- parallelamente preparare 2 provette MGIT a pH 5,6, che è un compromesso tra il pH ottimale per l'attività della Pirazinamide e quello ottimale per la crescita di *M. tuberculosis*, e contrassegnarle con GC e PZA;

- aggiungere sterilmente 0,8 ml di supplemento SIRE o supplemento PZA in ogni provetta, compresa quella del controllo di crescita;
- con una micropipetta trasferire sterilmente 0,1 ml di soluzione di ciascun antibiotico nella provetta MGIT corrispondente;
- vortexare bene la provetta MGIT madre positiva, eventualmente aggiungendo biglie di vetro per omogeneizzare i frustoli di micobatteri;
- aggiungere sterilmente, solo nelle quattro provette contenenti l'antibiotico, 0,5 ml di sospensione micobatterica (oppure della diluizione 1:5 se la coltura viene utilizzata da 3 a 5 giorni dopo la sua positività), prelevata dalla metà della provetta MGIT dopo averla vortexata;
- nella provetta del controllo di crescita aggiungere 0,5 ml della sospensione dell'organismo (oppure della diluizione 1:5), prelevata dalla metà della provetta MGIT vortexata e diluita ulteriormente 1:100 o 1:10 con soluzione fisiologica sterile rispettivamente per il SIRE e la PZA, senza aggiungere farmaci;
- introdurre il set di provette nello strumento, dopo aver selezionato il profilo di sensibilità che si intende testare (SIRE, PZA o alte e basse concentrazioni dei singoli antibiotici).

Il test di sensibilità SIRE ha una durata variabile di 4-13 giorni, mentre quello per la PZA di 4-22 giorni; una volta terminato lo strumento referta i risultati. In caso di nessuna crescita nei tubi con gli antibiotici, nel tempo in cui il GC raggiunge l'indice di crescita di 400, il ceppo risulterà sensibile. Se invece si sviluppa una crescita nei tubi con gli antibiotici che supera l'indice di crescita di 100, il ceppo risulterà resistente.

Un test di durata inferiore ai 4 giorni o superiore ai 13 o 22 giorni non è considerato valido:

- < 4 giorni: lo strumento segnala un allarme perchè siamo di fronte ad un sovra-inoculo, cioè o la provetta è contaminata o sono presenti troppi micobatteri;
- > 13 o 22 giorni: lo strumento segnala un allarme perché siamo di fronte ad un sotto-inoculo, quindi nella provetta di controllo non è stata rilevata sufficiente crescita.

In questi casi il set intero dei campioni e del controllo va rifatto.

3.2.4 GeneXpert MTB/RIF

La manualità del test GeneXpert MTB/RIF è ridotta al minimo e non richiede alcuna competenza di biologia molecolare; i test sono eseguibili singolarmente mediante l'impiego di una cartuccia (Figura 16).⁷³

- Diluire 0,5 ml di campione decontaminato in 1,5 ml di Sample Reagent, una soluzione di sodio idrossido ed isopropanolo progettata per l'utilizzo su campioni non decontaminati;
- vortexare e incubare per 15-20 minuti a temperatura ambiente;
- successivamente inoculare la cartuccia con il campione e caricarla nello strumento.



Figura 16 Flusso di lavoro del test GeneXpert MTB/RIF

Lo strumento è modulare, la versione più diffusa può contenere da 1 a 4 moduli per il caricamento di altrettanti campioni; esiste anche una versione con 16 postazioni. I moduli sono indipendenti tra loro per cui non è necessario caricare i campioni contemporaneamente. In caso di positività, i risultati sono riportati in modo semi-quantitativo (*high, medium, low, very low*) in base al valore del C_t . La resistenza alla Rifampicina viene refertata come presente o assente.

Il test GeneXpert MTB/RIF è dotato di due controlli interni: PCC (*Probe Check Control*), che verifica l'integrità dei probe e degli altri reagenti presenti nella cartuccia, e SPC (*Sample Processing Control*), che controlla il processo di estrazione del DNA e la presenza di eventuali sostanze inibenti l'amplificazione. I campioni inibiti vengono refertati come *invalid*, mentre i test abortiti come *no result*.

3.3 Quantiferon-TB Gold In-Tube

Il QFT-IT viene eseguito su sangue venoso intero e prevede la raccolta in tre provette da 1 ml ciascuna.⁷⁴

- provetta Nil: funge da controllo negativo ed è fondamentale per evidenziare nel sangue del paziente un eventuale *background* dato da IFN- γ aspecifico;
- provetta TB Antigen: contiene tre antigeni della regione RD1 di *M. tuberculosis*, ESAT-6, CFP-10 e TB 7.7;

- provetta Mitogeno: funge da controllo positivo. Contiene la PHA per stimolare in modo aspecifico la produzione di IFN- γ e rilevare la funzionalità dei linfociti T del paziente.

Dopo il prelievo le provette vengono agitate per inversione, per fare in modo che il sangue venga a contatto con gli antigeni e la PHA adesi alla parete, e successivamente incubate in posizione verticale per 16-24 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione le provette vengono centrifugate per 15 minuti a 3000 rpm per separare il plasma dalla parte corpuscolare: questo può essere subito utilizzato per l'immunodosaggio o conservato a 2-8°C per 4 settimane.

3.3.1 Immunodosaggio

La presenza di IFN- γ nei campioni di plasma viene determinata attraverso un immunodosaggio ELISA, che sfrutta anticorpi monoclonali murini anti-IFN- γ umano adesi sui pozzetti di una micropiastra, ed anticorpi secondari coniugati ad una perossidasi con substrato cromogeno, e consta di diversi passaggi (figura 17):

- ricostituire con acqua deionizzata lo Standard di IFN- γ umano liofilizzato per produrre la soluzione di lavoro di 8,0 UI/ml; successivamente produrre con lo specifico diluente (*Green Diluent*) 4 diluizioni seriali: Standard 1 (4,0 UI/ml); Standard 2 (1,0 UI/ml); Standard 3 (0,25 UI/ml); Standard 4 (0 UI/ml, solo Green Diluent). Effettuare le opportune diluizioni del Coniugato concentrato 100X con Green Diluent;
- dispensare in ogni pozzetto della micropiastra 50 μ l del Coniugato appena preparato;
- aggiungere 50 μ l dei campioni di plasma da testare e 50 μ l di ciascuno Standard (da 1 a 4, in duplicato);
- miscelare leggermente la piastra agitandola per 1 minuto e incubare a temperatura ambiente al buio per 120 minuti, durante i quali si ha la formazione dei complessi IFN γ -anticorpi anti-IFN- γ ;
- durante l'incubazione preparare la soluzione di lavaggio diluendo il tampone concentrato 20X con acqua deionizzata. Al termine delle 2 ore, lavare i pozzetti con 400 μ l di tampone di lavaggio per almeno 6 volte. Questa fase permette l'eliminazione del coniugato che non ha legato IFN- γ ;
- aggiungere 100 μ l di substrato enzimatico per la rilevazione dei complessi formati ed incubare a temperatura ambiente per 30 minuti. Il prodotto di questa reazione conferisce al pozzetto una colorazione di intensità proporzionale alla quantità di interferone originariamente presente;

- aggiungere 50 µl di soluzione di arresto enzimatico in ogni pozzetto e procedere, entro 5 minuti, alla lettura delle assorbanze (OD) alla lunghezza d'onda di 450 nm con filtro di riferimento a 620 nm mediante un lettore per ELISA;
- utilizzando il software fornito dalla ditta si estrapolano i valori di IFN- γ contenuti nei campioni: esso effettua una verifica del controllo di qualità del test e genera una curva standard che esprime la concentrazione di IFN- γ degli standard espressa in UI/ml e che verrà utilizzata per determinare la concentrazione di IFN- γ in ogni campione.

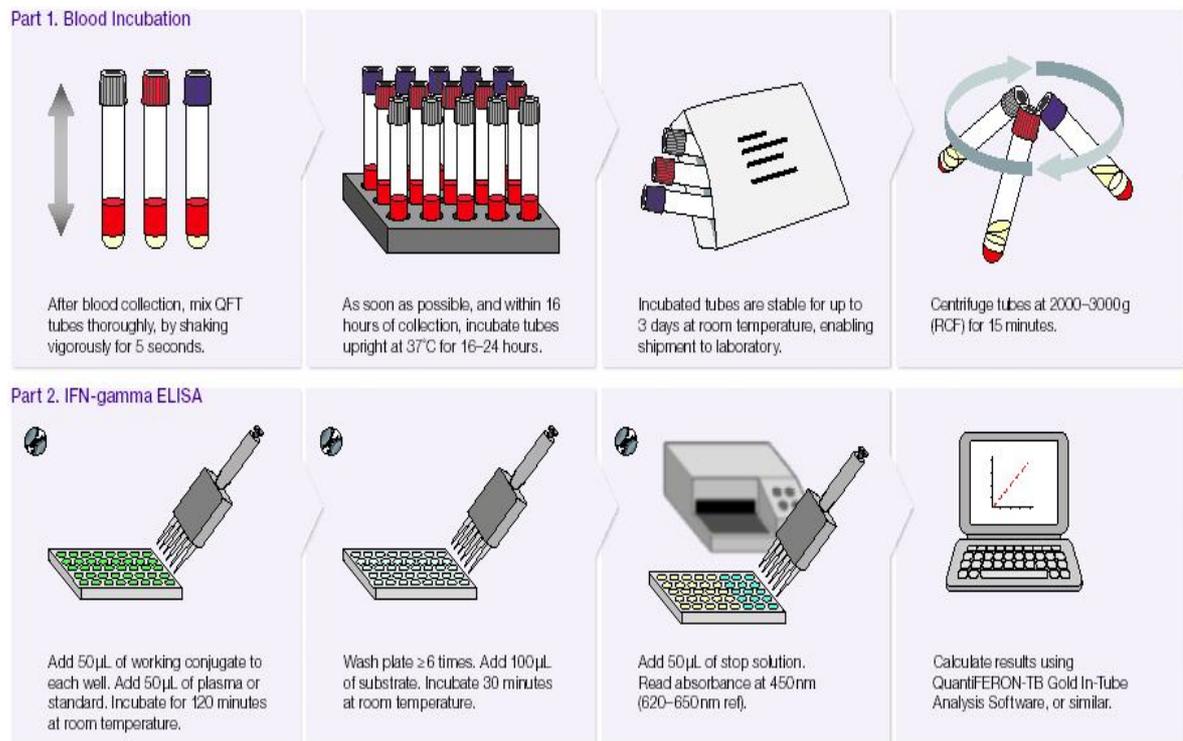


Figura 17 Schema riassuntivo di tutte le fasi di esecuzione del test Quantiferon-TB Gold In-Tube, dalla raccolta del campione all'elaborazione dei dati

Ad oggi l'immunodosaggio viene eseguito in maniera automatizzata mediante un analizzatore dedicato.

3.3.2 Elaborazione dei risultati

L'accuratezza dei risultati analitici dipende dall'idoneità della curva standard generata sui valori ottenuti dagli standard S1, S2, S3, S4; di conseguenza questi devono essere esaminati prima di interpretare i dati ottenuti dai campioni in esame.

Affinchè il test ELISA sia valido è necessario che vengano soddisfatti i seguenti criteri:

- il valore medio di OD dello Standard 1 deve essere ≥ 0.600 ;
- il Coefficiente di Variazione (CV) dei valori di OD dei duplicati dello Standard 1 e dello Standard 2 deve essere $\leq 15\%$;
- i valori di OD dello Standard 3 e dello Standard 4 non devono discostarsi di più di 0,40 unità dalla relativa media;
- il Coefficiente di Correlazione (r) calcolato sulla base dei valori medi di assorbanza degli standard deve essere ≥ 0.98 .

Se tali criteri calcolati dal software non sono soddisfatti il test non viene ritenuto valido e la seduta deve essere ripetuta.

Una volta accertata la validità del test, i valori di IFN- γ di ogni campione vengono calcolati sottraendo il *background* del rispettivo controllo negativo dal valore ottenuto dal TB Antigen.

Il cut-off del TB Antigen è pari a 0,35 UI/ml, ovvero quando il valore del campione supera di 0,35 UI/ml il valore del rispettivo controllo negativo l'infezione da MTB è ritenuta probabile e il risultato del test è positivo; quando invece è inferiore l'infezione viene ritenuta improbabile e il risultato è negativo.

Il risultato del test deve essere integrato con i valori ottenuti nelle provette di controllo (tabella 2): il controllo negativo deve essere sempre $< 0,8$ UI/ml, poiché un valore superiore può essere indice di attivazione linfocitaria aspecifica o contaminazione del campione durante il test; il controllo positivo, sottratto del *background*, deve essere sempre $> 0,5$ UI/ml. Un valore inferiore è indice di una insufficiente risposta immunitaria del soggetto: in questo caso lo stato di infezione non può essere definito e il test risulta indeterminato. Lo schema interpretativo del test è riassunto in tabella.

Controllo nullo [IU/ml]	Antigene TB meno controllo nullo [IU/ml]	Mitogeno meno controllo nullo [IU/ml] ¹	QuantiFERON®-Tb [IU/ml]	Rapporto/Interpretazione
$\leq 8,0$	$< 0,35$	$\geq 0,5$	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILE
	$\geq 0,35$ e $< 25\%$ del valore del controllo nullo	$\geq 0,5$		
	$\geq 0,35$ e $\geq 25\%$ del valore del controllo nullo	Qualsiasi	Positivo ²	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile
	$< 0,35$	$< 0,5$	Indeterminato ³	I risultati sono indeterminati per quanto attiene alla risposta all'antigene TB
$\geq 0,35$ e $< 25\%$ del valore del controllo nullo	$< 0,5$			
$> 8,0$ ⁴	Qualsiasi	Qualsiasi		

Tabella 2 Schema riassuntivo dell'elaborazione dei risultati del test Quantiferon TB-Gold In-Tube

3.4 Test Cutaneo Tubercolinico

Il Test Cutaneo Tubercolinico è stato eseguito presso l'Ambulatorio di Pneumotisiatria Territoriale di Bologna iniettando nei pazienti pediatrici 2 U di PPD (RT 23, Statens Serum Institute, Danimarca) mediante intradermoreazione secondo Mantoux. Gli indurimenti provocati dalla reazione di ipersensibilità ritardata sono stati misurati mediante palpazione a 48 e 72 ore e sono stati classificati come negativi (< 5 mm), intermedi (≥ 5 e < 10 mm) e positivi (≥ 10 mm) secondo la linee guida.⁷⁵

3.5 Definizione dei gruppi diagnostici

I pazienti pediatrici inclusi nello studio sono stati suddivisi in 5 gruppi in base al risultato clinico riportato nel fascicolo medico.

I bambini sono stati definiti con diagnosi di TB attiva secondo la diagnosi fatta dal medico in base ai criteri dell'OMS; in questa categoria sono stati inclusi i casi microbiologicamente-confermati, basati sulla positività della coltura e/o del test GeneXpert MTB/RIF, e casi clinicamente confermati, quando la diagnosi è stata posta sulla base della clinica dei reperti radiologici compatibili con la malattia e in seguito a nessun miglioramento dopo un ciclo completo di antibiotici, ma a un miglioramento clinico con trattamento anti-tubercolare. Tutti i bambini con diagnosi di tubercolosi attiva sono stati monitorati fino alla guarigione. I bambini sono stati classificati come diagnosi di TB esclusa, se, dopo aver eseguito un test QFT-IT per segni e sintomi suggestivi di TB con o senza TCT, è stata esclusa la malattia attiva ed è stata posta un'altra diagnosi al termine delle indagini e del trattamento. Secondo le linee guida nazionali,⁷¹ i bambini a contatto con un caso di TB attiva, prima dell'inserimento a scuola e quelli sottoposti a terapia immunosoppressiva sono stati indirizzati all'Unità di Pediatria e sottoposti a esame anamnestico, compreso lo stato di vaccinazione con BCG, a valutazione clinica, a radiografia del torace, ad analisi microbiologiche e immunologiche. Dopo aver escluso la TB attiva, i bambini sono stati classificati con la diagnosi di ITBL, dopo aver valutato il rischio di esposizione, lo stato di vaccinazione, il Paese di origine e i risultati dei test QFT-IT e TCT, al momento della prima visita e dopo 3 mesi. Tutti i bambini con diagnosi di ITBL sono stati messi in profilassi con Isoniazide e monitorati per 12 mesi. I bambini con fattori di rischio per la TB, come i contatti di un caso di TB attiva o quelli recentemente immigrati da un Paese endemico TB, con un risultato negativo alla prima indagine e che hanno confermato la negatività dopo 3 mesi sono stati diagnosticati come esposizione.

Sono stati esclusi dall'analisi i bambini con un risultato non specificato dei test o qualora avessero già avuto una diagnosi di TB attiva precedentemente trattata.

3.6 Analisi statistica

I confronti tra i risultati qualitativi dei test QFT-IT e TCT in base al Paese di origine, la vaccinazione con BCG, il motivo dello screening, la diagnosi e le fasce di età sono stati eseguiti mediante il test chi-quadro o test chi-quadro con trend, quando applicabile. Per la valutazione della concordanza diagnostica tra i due test, è stata calcolata la kappa di Cohen, quando possibile. I valori di sensibilità e specificità sono stati confrontati con il test di Mc Nemar.

La valutazione quantitativa della risposta IFN- γ al controllo negativo, agli antigeni specifici di MTB e al Mitogeno è stata effettuata prendendo in considerazione tutti i valori ottenuti nei QFT-IT risultati positivi, negativi ed indeterminati. Poiché il test QFT-IT non può determinare con accuratezza i valori IFN- γ > 10 UI/ml, a tali valori di plateau è stato attribuito convenzionalmente il valore di 10 UI/ml, come già adottato in letteratura, per consentire il calcolo statistico.^{76,77} Le mediane dei risultati quantitativi del test QFT-IT in base alle classi diagnostiche sono state confrontate con il test di Kruskal-Wallis. L'andamento dei valori di risposta IFN- γ al controllo negativo, agli antigeni specifici di MTB e al Mitogeno in funzione dell'età è stato analizzato mediante un'analisi di regressione lineare ed espresso dal coefficiente di correlazione di Spearman.

La significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma Graph Pad (USA).

4 Risultati

4.1 Descrizione della popolazione in studio

La popolazione in studio era costituita da 517 bambini di età compresa tra 0 e 16 anni afferenti all'Unità di Pediatria del Policlinico Universitario S. Orsola-Malpighi di Bologna, che avevano eseguito il test QFT-IT durante un periodo di 5 anni. Trecentottantaquattro bambini (74,3%) erano stati testati anche con il TCT. Di questi 18 bambini avevano avuto un risultato indeterminato al test QFT-IT e/o intermedio al TCT, quindi 366 pazienti presentavano risultati validi e appaiati di QFT-IT e TCT (figura 18).

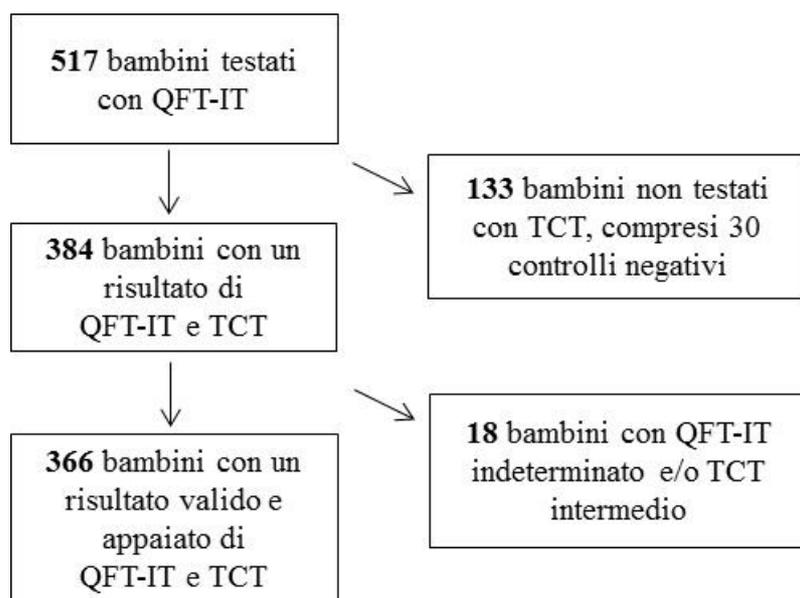


Figura 18 Diagramma di flusso dello studio

Nella popolazione in studio l'età media era di $5,4 \pm 4,0$ anni, 288 (55,7%) bambini erano maschi e 229 (44,3%) femmine. Novantotto (19,0%) bambini erano nati in Paesi a media/alta endemia per TB in accordo con i criteri dell'OMS;⁷⁸ dei 412 (79,7%) bambini nati in Italia, 197 (38,1%) erano nati da famiglie immigrate da Paesi a media/alta endemia tubercolare. L'origine della famiglia non era nota in 7 (1,3%) dei bambini nati in Italia.

Dei 451 bambini (87,2%) con uno stato vaccinale noto, 50 (11,1%) erano stati vaccinati con BCG.

In tabella 3 sono riportati il motivo dello screening, la vaccinazione con BCG e la diagnosi finale. I bambini erano stati sottoposti allo screening per infezione tubercolare per diversi motivi: 176 (34,1%) per sospetto clinico di tubercolosi attiva, 258 (49,9%) per screening dei contatti, 42 (8,1%) per recente immigrazione da Paesi endemici per TB e 11 (2,1%) per screening di routine prima della terapia immunosoppressiva. A questi sono stati aggiunti 30 (5,8%) bambini sottoposti al test QFT-IT nel corso di altre indagini cliniche non collegate alla tubercolosi come controlli negativi.

In base alla diagnosi, i bambini sono stati classificati in 5 gruppi diagnostici: TB attiva (n=45, 8,7%), infezione tubercolare latente (n=38, 7,4%), TB esclusa con diagnosi alternativa (n=159, 30,7%), esposizione (n=245, 47,4%) e controlli negativi (n=30, 5,8%).

		Vaccinazione con BCG	MOTIVO DELLO SCREENING					TOTALE
			Sospetto di TB attiva	Screening dei contatti	Recente immigrazione da area endemica	Terapia immunosoppressiva	Controlli negativi	
DIAGNOSI	TB attiva	3	25	18	2	-	-	45
	ITBL	8	3	23	12	-	-	38
	TB esclusa	7	148	-	-	11	-	159
	Esposizione	31	-	217	28	-	-	245
	Controlli negativi	1	-	-	-	-	30	30
TOTALE		50	176	258	42	11	30	517

Tabella 3 Distribuzione della popolazione in studio in base alla vaccinazione con BCG, al motivo dello screening e alla diagnosi

Nella categoria diagnostica TB esclusa, la diagnosi alternativa più frequente era stata polmonite (n=41, 25,8%), infezioni acute respiratorie e non-respiratorie (rispettivamente (n=16 e n=25, in totale 41%), linfadenopatie di eziologia non tubercolare (n=31, 19,5%) e malattie autoimmuni e/o neoplasia (n=22, 13,8%).

La distribuzione delle diagnosi in funzione dell'origine, quando conosciuta, è riportata in tabella 4 ed è risultata statisticamente significativa ($p < 0,0001$): come atteso la maggior percentuale di casi di TB attiva (51,1%) è stata riscontrata nei bambini nati in Italia da famiglia proveniente da Paesi ad alta endemia tubercolare, in quanto ad alto rischio di contatto con casi di TB attiva ma senza la protezione del vaccino. I casi

diagnosticati come esposizione sono risultati maggiormente a carico dei bambini nati in Paesi ad alta endemia tubercolare (53,9%), come atteso per il contesto epidemiologico.

ORIGINE	TOTALE	DIAGNOSI, n (%)				
		TB attive n=45	ITBL n=38	TB esclusa n= 159	Esposizione n=245	Controlli negativi n=30
Italiani	215	7 (15,6)	11 (28,9)	89 (56,0)	89 (36,3)	21 (70,0)
Nati in Italia da famiglia proveniente da Paese a media/alta endemia per TB	197	23 (51,1)	12 (31,6)	12 (7,6)	18 (7,3)	2 (6,7)
Nati in Paese a media/alta endemia per TB	98	15 (33,3)	15 (39,5)	57 (35,8)	132 (53,9)	7 (23,3)
Non nota	7	0	0	1 (0,6)	6 (2,5)	0

Tabella 4 Distribuzione della popolazione in studio in base all'origine e alla diagnosi

4.2 Risultati qualitativi del test Quantiferon-TB Gold In-Tube e del Test Cutaneo Tubercolinico

I risultati qualitativi del test QFT-IT erano così distribuiti nei 517 bambini: 79 (15,3%) positivi, 418 (80,8%) negativi e 20 (3,9%) indeterminati. Tra i 384 bambini testati anche con il TCT, 76 sono risultati positivi (19,8%), 290 (75,5%) negativi e 18 (4,7%) intermedi.

I bambini inclusi nello studio come controlli negativi erano stati testati solo con il test QFT-IT, risultato in tutti negativo, eccetto un indeterminato.

La distribuzione dei risultati qualitativi dei due test in base all'origine, alla vaccinazione con BCG, al motivo dello screening, alla diagnosi e all'età è riportata in tabella 5. Per l'analisi delle performance dei due test in base all'età i partecipanti sono stati divisi in 4 fasce di età: 109 (21,1%) bambini di età compresa tra 0 e 1,9 anni, 173 (33,5%) tra 2 e 4,9 anni, 154 (29,8%) tra 5 e 9,9 anni, 81 (15,6%) tra 10 e 16 anni.

	QFT-IT				TCT			
	Pazienti, n	Pos (%)	Neg (%)	Indet (%)	Pazienti, n	Pos (%)	Neg (%)	Interm (%)
TOTALE	517	79 (15,3)	418 (80,9)	20 (3,9)	384	76 (19,8)	290 (75,5)	18 (4,7)
Origine								
Italiani	215	18 (8,4)	182 (84,6)	15 (7,0)	139	10 (7,2)	127 (91,4)	2 (1,4)
Nati in Italia da famiglia proveniente da Paese a media/alta endemia per TB	197	33 (16,8)	161 (81,7)	3 (1,5)	159	27 (17,0)	128 (80,5)	4 (2,5)
Nati in Paese a media/alta endemia per TB	98	28 (28,6)	68 (69,4)	2 (2,0)	82	39 (47,6)	31 (37,8)	12 (14,6)
Non nota	7	0	7 (100)	0	4	0	4 (100)	0
Vaccinazione con BCG								
Vaccinati	50	9 (18,0)	41 (82,0)	0	46	28 (60,9)	8 (17,4)	10 (21,7)
Non vaccinati	401	54 (13,5)	329 (82,0)	18 (4,5)	293	35 (11,8)	253 (86,3)	5 (1,7)
Non nota	66	16 (24,2)	48 (72,7)	2 (3,0)	45	13 (28,9)	29 (64,6)	3 (6,7)
Motivo dello screening								
Sospetto di TB attiva	176	26 (14,8)	136 (77,3)	14 (7,9)	109	19 (17,4)	85 (78,0)	5 (4,6)
Screening dei contatti	258	40 (15,5)	217 (84,1)	1 (0,4)	231	28 (12,1)	196 (84,9)	7 (3,0)
Recente immigrazione da area endemica	42	11 (26,2)	31 (73,8)	0	41	29 (70,8)	6 (14,6)	6 (14,6)
Terapia immunosoppressiva	11	2 (18,2)	5 (45,5)	4 (36,3)	3	0	3 (100)	0
Controlli negativi	30	0	29 (96,7)	1 (3,3)	0	0	0	0
Diagnosi								
TB attiva	45	42 (93,3)	3 (6,7)	0	37	32 (86,5)	5 (13,5)	0
ITBL	38	34 (89,5)	4 (10,5)	0	37	24 (65,0)	9 (24,2)	4 (10,8)
TB esclusa	159	3 (1,9)	138 (86,8)	18 (11,3)	92	1 (1,1)	87 (94,6)	4 (4,3)
Esposizione	245	0	244 (99,6)	1 (0,4)	219	19 (8,7)	190 (86,8)	10 (4,5)
Controlli negativi	30	0	29 (96,7)	1 (3,3)	0	0	0	0
Fasce di età, anni								
0-1,9	109	11 (10,1)	94 (86,2)	4 (3,7)	82	7 (8,5)	72 (87,8)	3 (3,7)
2-4,9	173	20 (11,6)	144 (83,2)	9 (5,2)	128	19 (14,9)	100 (78,1)	9 (7,0)
5-9,9	154	26 (16,9)	123 (79,9)	5 (3,2)	118	33 (28,0)	81 (68,6)	4 (3,4)
10-16	81	22 (27,2)	57 (70,4)	2 (2,4)	56	17 (30,3)	37 (66,1)	2 (3,6)

Tabella 5 Distribuzione dei risultati qualitativi del test QFT-IT e del TCT in base all'origine, alla vaccinazione con BCG, al motivo dello screening, alla diagnosi e all'età. Indet=indeterminato, Interm=intermedio

In base all'origine si è evidenziato che i risultati dei due test erano statisticamente distribuiti in base all'endemia tubercolare del Paese di origine ($p < 0.0001$) come atteso,

mentre i risultati indeterminati del test QFT-IT erano più frequentemente riscontrati nei bambini italiani (7,0%, $p=0.0051$).

Rispetto alla vaccinazione con BCG, è risultato che la probabilità di avere un TCT positivo è significativamente più alta nei bambini vaccinati rispetto ai non vaccinati come atteso (rispettivamente 60,9% e 11,8%, $p < 0,0001$), mentre le percentuali di test QFT-IT positivi nei due gruppi non erano statisticamente differenziate (rispettivamente 18,0% e 13,5%).

In funzione del motivo dello screening, le evidenze statisticamente significative riguardavano i risultati indeterminati al test QFT-IT riscontrati principalmente nei bambini sottoposti a screening pre-terapia immunosoppressiva di tipo biologico (36,3% $p < 0,0001$), probabilmente perché già in terapia con immunosoppressori di altra tipologia, e i risultati positivi del TCT maggiormente concentrati nei bambini testati per il loro recente arrivo da aree endemiche per TB (70,8%), come atteso ($p < 0,0001$).

Risultati qualitativi dei test in base alla diagnosi

Quando la distribuzione in percentuale dei risultati qualitativi dei due test, mostrati in tabella 5, è stata rappresentata in base alla diagnosi (figura 19 A e B), si è reso evidente che i risultati positivi erano statisticamente associati alle diagnosi di TB attiva e ITBL ($p < 0,0001$), con percentuali maggiori per il test QFT-IT rispetto al TCT (rispettivamente 93,3% vs 86,5% nelle TB attive, 89,5% vs 65,0% nelle ITBL).

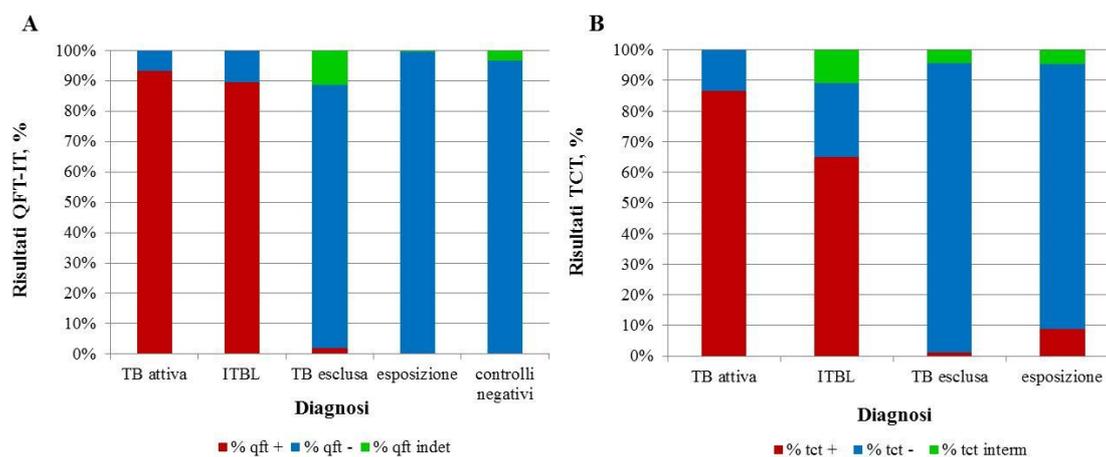


Figura 19 Istogrammi rappresentativi delle percentuali dei risultati qualitativi A) del test QFT-IT e B) del TCT in base alla diagnosi

Nessun test QFT-IT indeterminato è stato riscontrato nei pazienti con diagnosi di TB attiva o ITBL (figura 19 A), mentre i risultati indeterminati sono risultati

statisticamente associati alla categoria diagnostica TB esclusa in presenza di diagnosi alternative (18 casi, 90%, $p < 0,0001$).

Risultati qualitativi dei test in base all'età

Quando la distribuzione in percentuale dei risultati qualitativi dei due test, mostrati in tabella 5, è stata raffigurata in base all'età (figura 20 A e B), è risultato evidente l'andamento significativamente crescente dei risultati positivi di entrambi i test in funzione dell'età ($p = 0,0007$ per il QFT-IT e $p < 0,0001$ per il TCT), come atteso dalla maggior probabilità di entrare in contatto con casi di TB attiva con l'aumentare dell'età.

I risultati indeterminati del test QFT-IT non erano influenzati dall'età (figura 20 A), come dimostrato dalle percentuali che rimangono stabili nei diversi gruppi di età: 3,7% nei bambini di età tra 0 e 1,9 anni, 5,2% tra 2 e 4,9 anni, 3,2% tra 5 e 9,9 anni e 2,4% tra 10 e 16 anni.

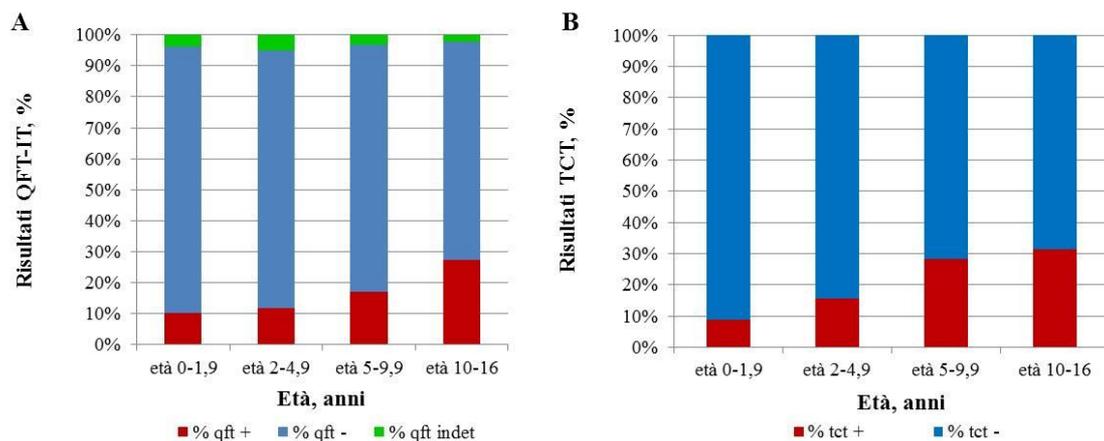


Figura 20 Istogrammi rappresentativi delle percentuali dei risultati qualitativi A) del test QFT-IT e B) del TCT in base all'età

4.3 Concordanza tra il test Quantiferon-TB Gold In-Tube e il Test Cutaneo Tubercolinico

Al fine di calcolare la concordanza tra i due test, sono stati esclusi i controlli negativi poiché non erano stati testati con il TCT e i pazienti con risultato indeterminato al test QFT-IT e quelli con risultato intermedio al TCT; perciò risultati validi e appaiati dei due test erano disponibili per 366 bambini.

La concordanza totale tra i due test è stata dell'89,9% ed è risultata buona, come definito dalla kappa di Cohen ($K=0.68$) (tabella 6). Cinquantatre bambini avevano risultati concordanti QFT+/TCT+ e 276 risultati QFT-/TCT-, mentre 23 avevano risultati discordanti QFT-/TCT+ e 14 QFT+/TCT-.

	TOTALE	QFT+ TST+	QFT+ TST-	QFT- TST+	QFT- TST-	Concordanza	K (95% CI)
Bambini con risultati validi e appaiati dei test QFT-IT e TCT	366	53	14	23	276	89,9%	0,68 (0,58 - 0,77)

Tabella 6 Distribuzione dei risultati concordanti e discordanti tra i due test nella popolazione in studio. K=kappa di Cohen

La distribuzione dei risultati concordanti e discordanti e la bontà della concordanza tra i due test sono stati analizzati in base al Paese di origine, alla vaccinazione con BCG, al motivo dello screening, alla diagnosi e all'età.

Concordanza tra i test in base all'origine

I risultati concordanti e discordanti e la concordanza tra i due test analizzati in base all'origine sono riportati in tabella 7. La concordanza tra il test QFT-IT e il TCT è stata buona per i bambini nati in Italia, indipendentemente dall'origine della famiglia (94,9% - 94,8%, rispettivamente $K=0,69$ e $0,83$), mentre è risultata modesta nei bambini nati in Paesi a media/alta endemia tubercolare (68,6%, $K=0,39$). In quest'ultimo gruppo, 19 su 22 pazienti hanno presentato risultati discordanti QFT-/TCT+, 18 dei quali erano vaccinati con BCG.

ORIGINE	TOTALE	QFT+ TST+	QFT+ TST-	QFT- TST+	QFT- TST-	Concordanza	K (95% CI)
Italiani	137	9	6	1	121	94,9%	0,69 (0,48 - 0,91)
Nati in Italia da famiglia proventiente da Paese a media/alta endemia per TB	155	24	5	3	123	94,8%	0,83 (0,71 - 0,94)
Nati in Paese a media/alta endemia per TB	70	20	3	19	28	68,6%	0,39 (0,21 - 0,58)
Non nota	4	0	0	0	4	nd	nd

Tabella 7 Distribuzione dei risultati concordanti e discordanti tra i due test in base all'origine. Nd=non definibile, K=kappa di Cohen

Concordanza tra i test in base alla vaccinazione

La distribuzione dei risultati concordanti e discordanti e la concordanza tra i due test in base alla vaccinazione sono riportati in tabella 8. Nei pazienti vaccinati la concordanza tra il test QFT-IT e il TCT è risultata scarsa (41,7%, $K=0,08$), con il prevalere (20 su 21) di risultati discordanti QFT-/TCT+ per la cross-reazione nei bambini vaccinati con BCG, come atteso. Nei pazienti non vaccinati la concordanza si è dimostrata elevata (95,6%, $K=0,83$).

VACCINAZIONE CON BCG	TOTALE	QFT+ TST+	QFT+ TST-	QFT- TST+	QFT- TST-	Concordanza	K (95% CI)
Vaccinati	36	8	1	20	7	41,7%	0,08 (-0,07–0,25)
Non vaccinati	288	35	12	0	241	95,8%	0,83 (0,74–0,92)
Sconosciuta	42	10	1	3	28	90,5%	0,77 (0,55–0,98)

Tabella 8 Distribuzione dei risultati concordanti e discordanti tra i due test in base alla vaccinazione con BCG. K =kappa di Cohen

Concordanza tra i test in base al motivo dello screening

Quando è stata valutato il motivo dello screening (tabella 9), la concordanza tra i test è risultata elevata in caso di sospetta tubercolosi (96,1%, $K=0,87$) e screening dei contatti (94,2%, $K=0,77$), mentre è stata scarsa in caso di screening di bambini immigrati di recente da aree endemiche per TB (42,8%, $K=0,08$). In questa categoria 19 su 20 risultati discordanti sono stati QFT-/TCT+, 16 dei quali erano vaccinati con BCG.

MOTIVO DELLO SCREENING	TOTALE	QFT+ TST+	QFT+ TST-	QFT- TST+	QFT- TST-	Concordanza	K (95% CI)
Sospetto di TB attiva	104	17	2	2	83	96,1%	0,87 (0,75 - 0,99)
Screening dei contatti	224	26	11	2	185	94,2%	0,77 (0,60 - 0,88)
Recente immigrazione da area endemica	35	10	1	19	5	42,8%	0,08 (-0,09 - 0,25)
Terapia immunosoppressiva	3	0	0	0	3	nd	nd

Tabella 9 Distribuzione dei risultati concordanti e discordanti tra i due test in base al motivo dello screening. Nd=non definibile, K=kappa di Cohen

Concordanza tra i test in base alla diagnosi

Una volta stabilita una diagnosi finale, è stato possibile valutare l'accordo tra i due test in base a questo criterio (tabella 10). La concordanza è stata elevata nei casi di diagnosi alternativa alla TB (97,7%) e buona nei bambini con diagnosi di esposizione (90,9%); tra i 19 casi con risultati discordanti QFT-/TCT+, 17 erano vaccinati con BCG. La concordanza è stata moderata nei bambini con diagnosi di TB attiva (86,0%), con i casi discordanti dovuti principalmente a 4 risultati QFT+/TCT-, e modesta nei bambini con diagnosi di ITBL (66,7%), principalmente imputabile a 9 casi discordanti QFT+/TCT-.

DIAGNOSI	TOTALE	QFT+ TST+	QFT+ TST-	QFT- TST+	QFT- TST-	Concordanza	K (95% CI)
TB attiva	37	31	4	1	1	86,0%	0,23 (-0,22 - 0,67)
ITBL	33	22	9	2	0	66,7%	-0,11 (-0,24 - 0,02)
TB esclusa	88	0	1	1	86	97,7%	-0,001 (-0,03 - 0,004)
Esposizione	208	0	0	19	189	90,9%	nd

Tabella 10 Distribuzione dei risultati concordanti e discordanti tra i due test in base alla diagnosi. Nd=non definibile, K=kappa di Cohen

La distribuzione, in percentuale, dei risultati concordanti e discordanti dei due test riportata nell'istogramma in figura 21, è risultata statisticamente significativa ($p < 0,0001$). Si evidenzia che la maggior percentuale di risultati concordanti QFT+/TCT+ è stata riscontrata nei pazienti con diagnosi di TB attiva (83,8%) e ITBL (66,7%) e che i risultati concordanti QFT-/TCT- erano principalmente associati alle diagnosi alternative alla TB (97,7%) e di esposizione (90,9%). Inoltre, la maggior percentuale di risultati discordanti, rappresentata dai casi QFT+/TCT-, è stata riscontrata nelle diagnosi di ITBL (27,3%).

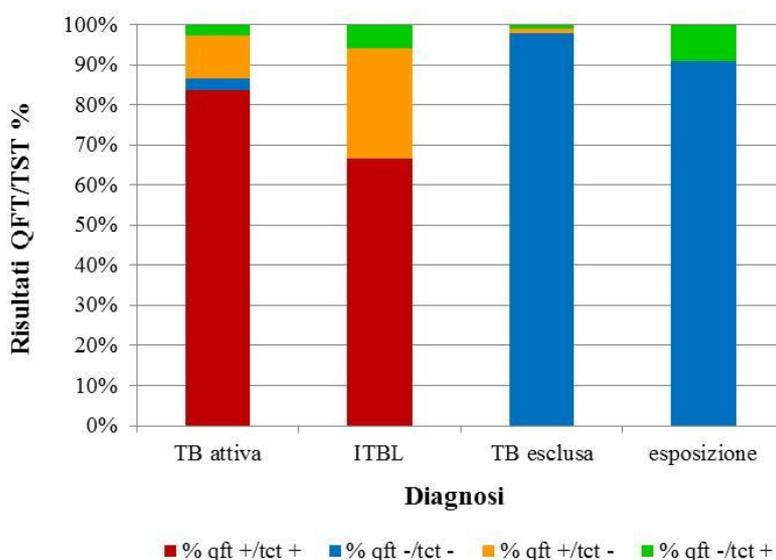


Figura 21 Istogramma rappresentativo delle percentuali dei risultati concordanti e discordanti tra i due test in base alle diagnosi

Concordanza tra i test in base all'età

Quando la concordanza tra i due test è stata analizzata in base all'età, i test hanno mostrato una concordanza da buona (85,1%) a elevata (95,0%) in tutti i gruppi di età (tabella 11).

FASCE D'ETA'	TOTALE	QFT+ TST+	QFT+ TST-	QFT- TST+	QFT- TST-	Concordanza	K (95% CI)
0-1,9 anni	79	5	5	2	67	91,1%	0,54 (0,24–0,84)
2-4,9 anni	119	15	2	4	98	95,0%	0,80 (0,65–0,96)
5-9,9 anni	114	20	4	13	77	85,1%	0,61 (0,44–0,77)
10-16 anni	54	13	3	4	34	87,0%	0,69 (0,49–0,90)

Tabella 11 Distribuzione dei risultati concordanti e discordanti tra i due test in base all'età. K=kappa di Cohen

Quando la distribuzione delle percentuali dei risultati concordanti e discordanti dei due test è stata riportata in istogramma, i risultati concordanti QFT+/TCT+ hanno mostrato un trend in significativo aumento ($p=0.0022$), passando dal 6,3% nei bambini di età compresa tra 0-1,9 anni, al 12,6% (2-4,9 anni), 17,5% (5-9,9 anni) e 24,1% (10-16 anni) (figura 22).

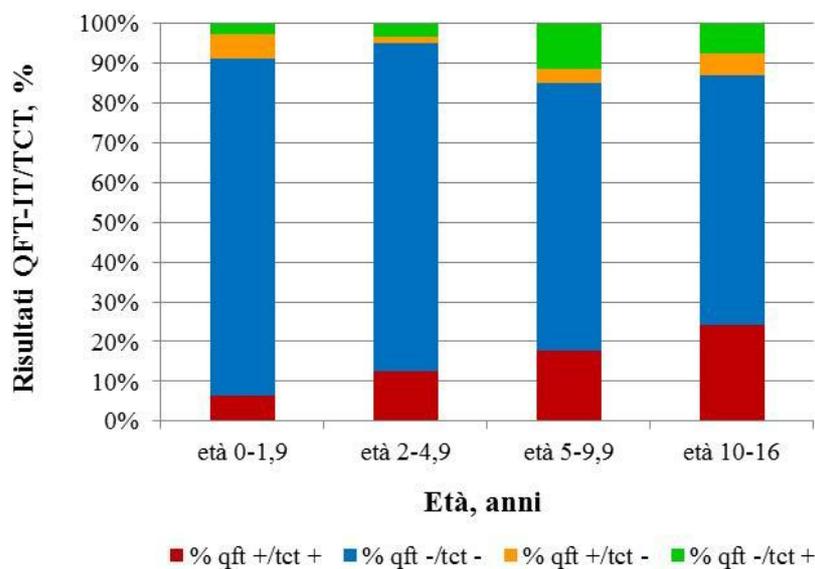


Figura 22 Istogramma rappresentativo delle percentuali dei risultati concordanti e discordanti tra i due test in base alle fasce d'età

Concordanza tra i test in base alla diagnosi e all'età

Per studiare ulteriormente gli effetti dell'età sulle performance dei due test per la diagnosi di TB attiva e latente, i risultati del QFT-IT e del TCT in questi due gruppi diagnostici sono stati suddivisi per le 4 fasce di età (tabella 12).

Osservando le percentuali di test positivi, il test QFT-IT si dimostra funzionare bene in tutte le fasce di età sia per la diagnosi di TB attiva che di ITBL, mentre il TCT mostra una frequenza minore di positività nei bambini < 2 anni per entrambe le diagnosi (rispettivamente 57,1% per TB attiva e 33,3% per ITBL).

FASCE D'ETÀ, ANNI	QFT-IT			TCT		
	Pazienti, n	Pos (%)	Neg (%)	Pazienti, n	Pos (%)	Neg (%)
TB attiva						
0-1,9	8	8 (100)	0 (0)	7	4 (57,1)	3 (42,9)
2-4,9	13	12 (92,3)	1 (7,7)	12	11 (91,7)	1 (8,3)
5-9,9	12	11 (91,7)	1 (8,3)	11	10 (90,9)	1 (9,1)
10-16	12	11 (91,7)	1 (8,3)	7	7 (100)	0 (0)
ITBL						
0-1,9	4	3 (75)	1 (25)	3	1 (33,3)	2 (66,7)
2-4,9	9	8 (88,9)	1 (11,1)	6	4 (66,7)	2 (33,3)
5-9,9	16	15 (93,7)	1 (6,3)	15	12 (80)	3 (20)
10-16	9	8 (88,9)	1 (11,1)	9	7 (77,8)	2 (22,2)

Tabella 12 Distribuzione dei risultati qualitativi del test QFT-IT e TCT per fascia di età nelle diagnosi di TB attiva e ITBL

L'analisi della concordanza è stata eseguita sui i test appaiati che avevano un risultato valido (tabella 13). La concordanza è risultata bassa nei bambini < 2 anni sia per la diagnosi di TB attiva che di ITBL (57,1% e 33,3%, rispettivamente), principalmente dovuto ai risultati discordanti QFT+/TCT- (3 e 2 casi, rispettivamente). Nei bambini > 2 anni i due test hanno mostrato risultati confrontabili per la diagnosi di TB attiva e la concordanza si è dimostrata alta (81,8% - 100%). Al contrario, la concordanza tra i due test per la diagnosi di ITBL è stata bassa (66,7% - 73,3%): tra i 9 bambini con risultati discordanti 7 erano QFT+/TCT- e 2 erano QFT-/TCT+.

FASCE D'ETÀ, ANNI	TOTALE	QFT+ TCT+	QFT+ TCT-	QFT- TCT+	QFT- TCT-	Concordanza
TB attiva						
0-1,9	7	4	3	0	0	57,1%
2-4,9	12	11	0	0	1	100%
5-9,9	11	9	1	1	0	81,8%
10-16	7	7	0	0	0	100%
ITBL						
0-1,9	3	1	2	0	0	33,3%
2-4,9	6	4	2	0	0	66,7%
5-9,9	15	11	3	1	0	73,3%
10-16	8	6	2	1	0	66,7%

Tabella 13 Distribuzione dei risultati concordanti e discordanti tra i due test per fascia di età nelle diagnosi di TB attiva e ITBL

4.4 Sensibilità del test Quantiferon-TB Gold In-Tube e del Test Cutaneo Tubercolinico in pazienti sintomatici

La sensibilità e la specificità del test QFT-IT e del TCT sono state calcolate confrontando i pazienti con TB attiva con quelli con sintomi e/o segni compatibili con la malattia, ma con diagnosi finale di esclusione della TB. I pazienti con ITBL sono stati esclusi da questa analisi poichè i risultati di entrambi i test contribuiscono alla definizione di questa diagnosi e non esiste un *gold standard* per confrontare le performance di ciascun test.

Tra i 176 bambini arruolati per sospetto di TB attiva, in 148 è stata posta una diagnosi alternativa alla TB, nonostante presentassero sintomi di al momento dell'arruolamento. Tra questi, 14 avevano un risultato indeterminato al test QFT-IT e sono stati esclusi dall'analisi, perciò l'analisi di specificità per il test QFT-IT è stata condotta su 134 bambini. Per il calcolo della specificità del TCT sono stati analizzati 125 bambini sintomatici con un risultato valido del TCT e sospetto di TB attiva, da cui sono stati esclusi i 37 casi diagnosticati come TB attiva.

Nei 45 pazienti con diagnosi finale di TB attiva, la diagnosi era stata confermata microbiologicamente in 22 bambini, invece era stata posta solo su base clinica in 23. I

pazienti con TB attiva erano stati screenati per sintomi suggestivi in 25 casi, mentre 18 erano stati sottoposti a screening in quanto contatti di un caso di TB attiva e 2 perché immigrati di recente da Paesi ad alta prevalenza tubercolare.

Tra le TB confermate microbiologicamente, il test QFT-IT ha dato risultati positivi in 21 su 22 casi (95,5%) e il TCT in 13 su 14 (92,9%); nei casi confermati clinicamente il test QFT-IT è stato positivo in 21 su 23 pazienti (91,3%), mentre TCT è stato positivo in 19 su 23 casi (82,6%).

In base alla localizzazione, 35 casi hanno avuto una TB polmonare con risultato positivo al QFT-IT in 32 su 35 (91,4%), mentre il TCT è risultato positivo in 26 su 30 casi (86,7%); nelle 10 TB extra-polmonari il test QFT-IT è risultato positivo in tutti i casi (100%), mentre il TCT in 6 su 7 (85,7%).

Non ci sono state differenze significative nella sensibilità totale tra il test QFT-IT (93,3%) e il TCT (86,5%) (tabella 14).

	QFT-IT			TCT	
	Sensibilità % (95%CI)	Specificità % (95%CI)		Sensibilità % (95%CI)	Specificità % (95%CI)
TB ATTIVA n=45	93,3 (81,7–98,6)	99,3 (95,9–100)	TB ATTIVA n=37	86,5 (71,2–95,5)	98,9 (93,9–100)
FASCE D’ETÀ, ANNI			FASCE D’ETÀ, ANNI		
0-1,9 (n=8)	100 (63,1–100)	100 (88,1–100)	0-1,9 (n=7)	57,1 (18,4–90,1)	100 (81,5–100)
2-4,9 (n=13)	92,3 (64,0–99,8)	100 (91,7–100)	2-4,9 (n=12)	91,7 (61,5–99,8)	96,4 (81,6–99,9)
5-9,9 (n=12)	91,7 (61,5–99,8)	100 (91,0–100)	5-9,9 (n=11)	90,9 (58,7–99,8)	100 (87,2–100)
10-16 (n=12)	91,7 (61,5–99,8)	95,8 (78,9–99,9)	10-16 (n=7)	100 (59,0–100)	100 (73,5–100)

Tabella 14 Sensibilità e specificità del test QFT-IT e del TCT per la diagnosi di tubercolosi attiva

Nei bambini < 2 anni con diagnosi di TB attiva, la sensibilità del test QFT-IT è stata significativamente più alta (100%, 95% CI: 63,1-100%) rispetto a quella del TCT (57,1%, 95% CI: 18,4-90,1%) (p=0,0454). Nei bambini > 2 anni la sensibilità è risultata alta per entrambi i test senza differenze significative. In particolare, tra i

diversi gruppi di età > 2 anni la sensibilità del test QFT-IT variava dal 91,7% al 92,3%, mentre la sensibilità TCT variava dal 90,9% al 100%.

La specificità complessiva è stata alta per entrambi i test (rispettivamente 99,3% e 98,9% per il test QFT-IT e il TCT) e non è stata influenzata dalle fasce di età. La specificità del TCT non è stata influenzata dalla vaccinazione con BCG poichè nella popolazione di bambini sintomatici con diagnosi alternativa alla TB pochi (4 su 88) erano vaccinati.

4.5 Quantiferon-TB Gold In-Tube indeterminati

Nella popolazione in studio 20 (3,9%) pazienti avevano un risultato indeterminato al test QFT-IT come riportato in tabella 5. In tabella 15 sono descritte le caratteristiche demografiche e cliniche dei bambini risultati indeterminati al test QFT-IT.

In base all'origine, si evidenzia che il risultato indeterminato del test QFT-IT era più frequentemente riscontrato nei bambini italiani ($p=0.0051$).

I risultati indeterminati si sono rivelati statisticamente associati alla diagnosi alternativa alla TB (18 casi, 90%, $p<0,0001$), mentre nei pazienti con diagnosi di TB attiva o ITBL non è stato riscontrato nessun test QFT-IT indeterminato, come descritto in tabella 5 e figura 19.

Nelle diagnosi alternative alla TB i risultati indeterminati erano così distribuiti: 6 su 22 (27,3%) pazienti con malattia autoimmune o neoplasia, 7 su 41 (17,1%) con polmonite, 3 su 25 (12,0%) con infezione non-respiratoria acuta, 1 su 16 (6,3%) con infezione respiratoria acuta e 1 su 31 (3,2%) con linfadenopatia non-tubercolare. I 2 restanti risultati indeterminati si sono verificati in 1 dei 245 (0,4%) pazienti diagnosticati come esposti e in 1 dei 30 (3,3%) controlli negativi. Nel complesso quindi le diagnosi più frequentemente associate ad un risultato indeterminato del test QFT-IT sono state la polmonite e la malattia autoimmune/neoplastica, rispettivamente nel 35% e nel 30% dei casi.

I risultati indeterminati del test QFT-IT non sono stati influenzati dall'età, come dimostrato dalle percentuali che rimangono stabili nei diversi gruppi di età: 3,7% nei bambini di età tra 0 e 1,9 anni, 5,2% tra 2 e 4,9 anni, 3,2% tra 5 e 9,9 anni e 2,4% tra 10 e 16 anni.

Paziente	Età	Luogo di nascita	Paese di origine della famiglia	Gruppo diagnostico	Diagnosi	TCT
B. L.	5,5	Italia	Italia	Controllo negativo	-	Non eseguito
T. M.	3,7	Italia	Italia	Esposizione	-	Non noto
K. T.	0,3	Italia	Pakistan	TB esclusa	Infezione acuta non-respiratoria	Non noto
A. R.	3,7	Pakistan	Pakistan	TB esclusa	Infezione acuta non-respiratoria	Non noto
B. A.	7,0	Italia	Italia	TB esclusa	Infezione acuta non-respiratoria	Negativo
F. A.	0,9	Italia	Albania	TB esclusa	Infezione acuta respiratoria	Non noto
R. L.	2,1	Italia	Italia	TB esclusa	Malattia autoimmune	Negativo
T. E.	4,8	Italia	Italia	TB esclusa	Malattia autoimmune	Non noto
L. G.	6,8	Italia	Italia	TB esclusa	Malattia autoimmune	Negativo
O. A.	8,9	Italia	Italia	TB esclusa	Malattia autoimmune	Non noto
T. T.	1,9	Italia	Italia	TB esclusa	Neoplasia	Non noto
V. C.	2,2	Venezuela	Venezuela	TB esclusa	Neoplasia	Non noto
M. R.	2,8	Italia	Italia	TB esclusa	Linfoadenopatia non-tubercolare	Non noto
B. A.	0,8	Italia	Pakistan	TB esclusa	Polmonite	Non noto
T. D.	3,2	Italia	Italia	TB esclusa	Polmonite	Negativo
G. L.	4,1	Italia	Italia	TB esclusa	Polmonite	Negativo
D. G.	4,7	Italia	Italia	TB esclusa	Polmonite	Non noto
D. A.	8,6	Italia	Italia	TB esclusa	Polmonite	Negativo
A. L.	10,0	Italia	Italia	TB esclusa	Polmonite	Non noto
A.S.	14,0	Italia	Italia	TB esclusa	Polmonite	Non noto

Tabella 15 Caratteristiche dei pazienti pediatrici con test QFT-IT indeterminato

Tutti i risultati indeterminati sono stati causati da una bassa risposta al controllo positivo, eccetto un caso dovuto a un'elevata risposta aspecifica al controllo negativo in un paziente con diagnosi finale di enterite causata da Rotavirus.

In 3 pazienti con esito indeterminato, il test QFT-IT è stato ripetuto a un mese di distanza: 2 di loro sono risultati negativi e 1 è rimasto indeterminato.

Il TCT era disponibile in 6 casi con test QFT-IT indeterminato, tutti risultati negativi.

4.6 Analisi quantitativa del test Quantiferon-TB Gold In-Tube in base alla diagnosi

E' stata valutata la risposta quantitativa ai diversi stimoli del test QFT-IT in tutta la popolazione pediatrica in studio suddivisa nei cinque gruppi diagnostici. Sono stati presi in considerazione i valori di IFN- γ ottenuti nei test QFT-IT positivi, negativi ed indeterminati e le mediane dei diversi gruppi diagnostici sono state confrontate con il test di Kruskal-Wallis.

Il cut-off per la positività del test è fissato a 0,35 UI IFN- γ /ml in risposta agli antigeni specifici di MTB, dopo aver sottratto il *background* rilevato nel controllo negativo. Il test è considerato indeterminato quando il valore di IFN- γ in risposta al controllo positivo, sottratto del *background* rilevato nel controllo negativo, è $< 0,5$ UI IFN γ /ml. Per consentire il calcolo statistico è stato attribuito convenzionalmente il valore di 10 UI/ml in caso di valori di IFN- $\gamma > 10$ UI/ml.^{76,77}

Risposta IFN- γ al controllo negativo

La distribuzione dei risultati quantitativi di rilascio di IFN- γ nel tubo di controllo negativo (Nil) del test QFT-IT nei diversi gruppi diagnostici è mostrata nello *scatter plot* in figura 23.

I valori di IFN- γ in risposta al controllo negativo sono risultati significativamente differenti tra i gruppi diagnostici.

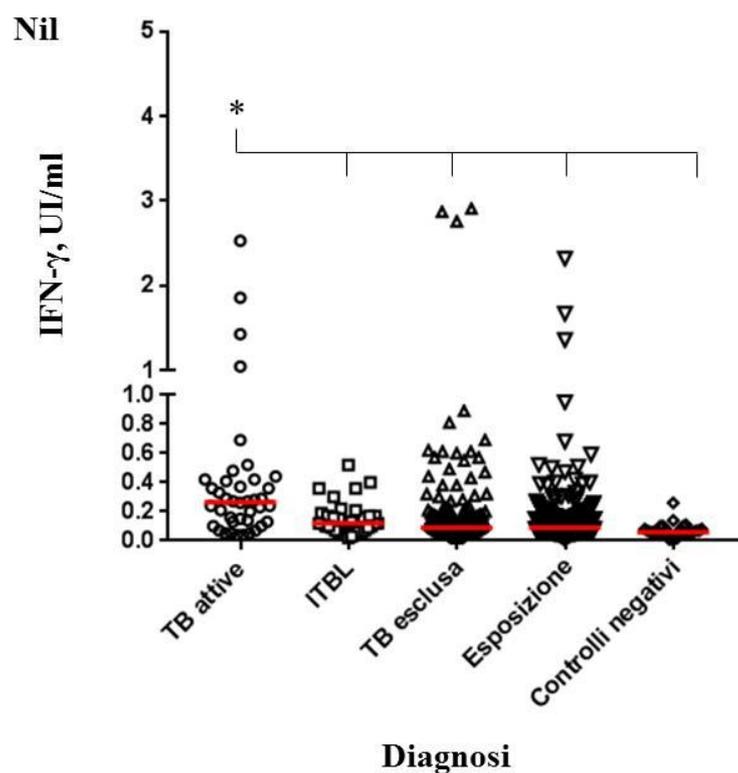


Figura 23 Distribuzione dei risultati quantitativi di rilascio di IFN- γ nel tubo di controllo negativo del test QFT-IT (Nil) in base alla diagnosi. Le mediane sono indicate da una linea rossa, le differenze significative sono contrassegnate da *

In particolare, come riportato in tabella 16, nei pazienti con TB attiva la mediana dei valori di Nil (0,27 UI/ml) è risultata statisticamente più alta di quelle riscontrate in tutti i bambini con altre diagnosi ($p < 0,0001$).

DIAGNOSI	Mediana e range di risposta IFN- γ al Nil, UI/ml
TB attiva	0,27 (0,13-0,42)
ITBL	0,12 (0,07-0,17)
TB esclusa	0,09 (0,05-0,17)
Esposizione	0,09 (0,06-0,16)
Controlli negativi	0,06 (0,05-0,08)

Tabella 16 Valori mediani e range interquartile della risposta IFN- γ al controllo negativo del test QFT-IT in base alla diagnosi

Risposta IFN- γ agli antigeni specifici di MTB

La distribuzione dei risultati quantitativi di rilascio di IFN- γ in risposta agli antigeni specifici di MTB del test QFT-IT, sottratti del valore del controllo negativo, nei diversi gruppi diagnostici è mostrata nello *scatter plot* in figura 24.

Come atteso, si osserva che la risposta al TB Antigen era significativamente diversa tra i gruppi diagnostici ($p=0,0001$), con la maggior parte dei valori positivi ($> 0,35$ UI/ml) nelle diagnosi di TB attiva e ITBL.

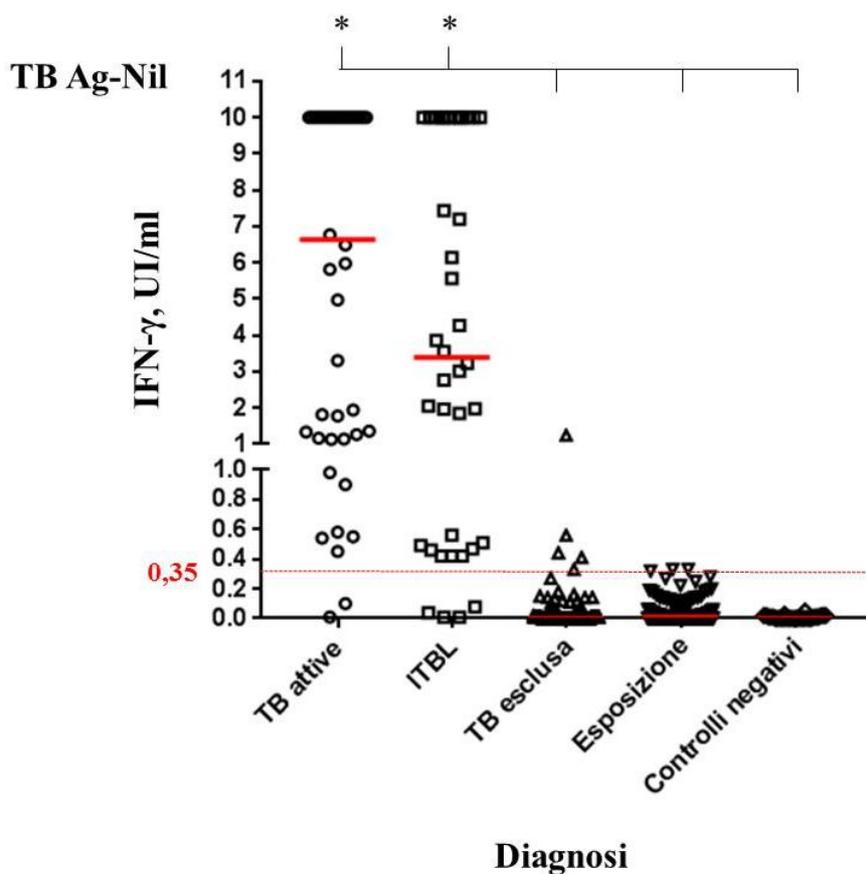


Figura 24 Distribuzione dei risultati quantitativi di rilascio di IFN- γ nel tubo con antigeni specifici di MTB (TB Ag) del test QFT-IT, sottratti del valore del controllo negativo, in base alla diagnosi. Le mediane sono indicate da una linea rossa, il valore di cut-off a 0,35 UI/ml per la positività del test è rappresentato da una linea rossa punteggiata, le differenze significative sono contrassegnate da *

In particolare, come riportato in tabella 17, i valori mediani più alti sono stati osservati nella diagnosi di TB attiva (6,63 UI/ml) e ITBL (3,39 UI/ml), anche se non questi non erano statisticamente differenti tra loro.

DIAGNOSI	Mediana e range di risposta IFN-γ al TB Antigen-Nil, UI/ml
TB attiva	6,63 (1,18-10)
ITBL	3,39 (0,49-10)
TB esclusa	0 (0-0,03)
Esposizione	0,01 (0-0,04)
Controlli negativi	0 (0-0,01)

Tabella 17 Valori mediani e range interquartile di IFN- γ in risposta agli antigeni specifici di MTB del test QFT-IT, sottratti del valore del controllo negativo, in base alla diagnosi

Risposta IFN- γ al Mitogeno

In figura 25 è riportato lo *scatter plot* della distribuzione dei risultati quantitativi di rilascio di IFN- γ in risposta al Mitogeno del test QFT-IT, sottratti del valore del controllo negativo, nei diversi gruppi diagnostici.

La distribuzione è risultata significativamente diversa nelle varie classi diagnostiche ($p=0,0023$).

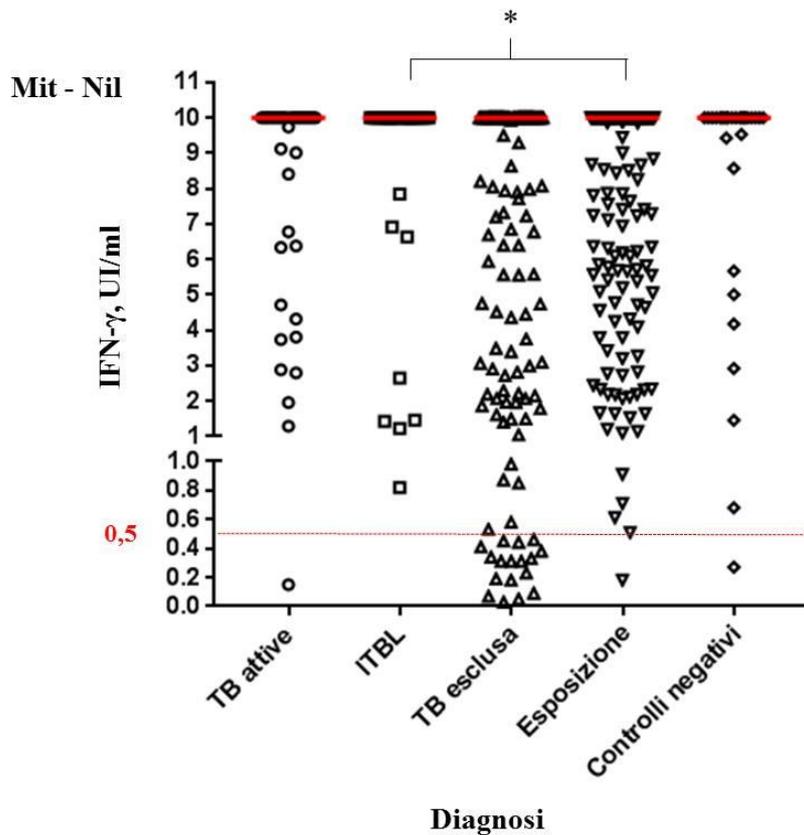


Figura 25 Distribuzione dei risultati quantitativi di rilascio di IFN- γ nel tubo di controllo positivo (Mitogeno) del test QFT-IT, sottratti del valore del controllo negativo, in base alla diagnosi. Le mediane sono indicate da una linea rossa, il valore di cut-off a 0,5 UI/ml per il risultato indeterminato del test è rappresentato da una linea rossa punteggiata, le differenze significative sono contrassegnate da *

In particolare, come riportato in tabella 18, il valore del 25% percentile del range di risposta al Mitogeno è risultato più basso nei bambini con diagnosi alternative alla TB (2,90 UI/ml). Questa evidenza è coerente con la maggior percentuale di risultati indeterminati del test QFT-IT in questa categoria diagnostica rispetto alle altre diagnosi già riportata in figura 19 A.

DIAGNOSI	Mediana e range di risposta IFN- γ al Mitogeno- <i>Nil</i> , UI/ml
TB attiva	10 (6,35-10)
ITBL	10 (10-10)
TB esclusa	10 (2,90-10)
Esposizione	10 (7,35-10)
Controlli negativi	10 (7,86-10)

Tabella 18 Valori mediani e range interquartile di IFN- γ in risposta al Mitogeno del test QFT-IT, sottratti del valore del controllo negativo, in base alla diagnosi

4.7 Analisi quantitativa del test Quantiferon-TB Gold In-Tube in base all'età

Per valutare l'andamento della risposta quantitativa ai diversi stimoli del test QFT-IT con l'età della popolazione pediatrica in studio, sono stati presi in considerazione i valori di risposta IFN- γ ai diversi stimoli (*Nil*, TB Antigen, Mitogeno) ottenuti nei test QFT-IT positivi, negativi ed indeterminati ed è stata condotta un'analisi di regressione lineare in funzione dell'età.

Il cut-off per la positività del test è fissato a 0,35 UI IFN- γ /ml in risposta agli antigeni specifici di MTB, dopo aver sottratto il *background* rilevato nel controllo negativo. Il test è considerato indeterminato quando il valore di IFN- γ in risposta al controllo positivo, sottratti del *background* rilevato nel controllo negativo, è < di 0,5 UI IFN γ /ml.

Per consentire il calcolo statistico è stato attribuito convenzionalmente il valore di 10 UI/ml in caso di valori di IFN- γ > 10 UI/ml.^{76,77}

Risposta IFN- γ al controllo negativo

La distribuzione dei valori di risposta IFN- γ al controllo negativo del test QFT-IT in funzione dell'età è riportata in figura 26.

L'analisi di regressione lineare non ha evidenziato un andamento significativo del valore del *Nil* all'aumentare dell'età (r Spearman=-0,0301, p=0,4970).

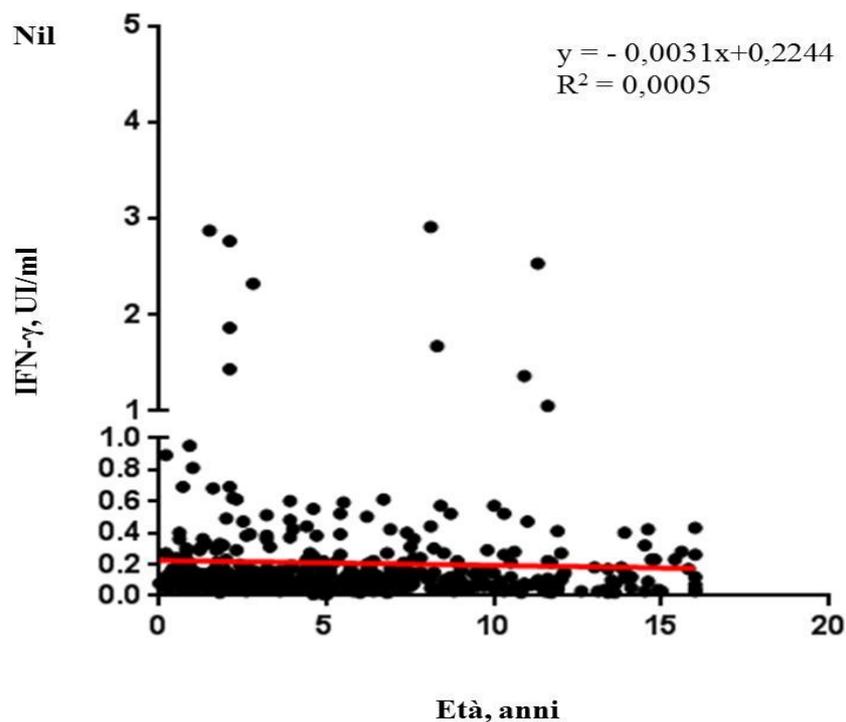


Figura 26 Analisi di regressione lineare della risposta IFN γ al controllo negativo del test QFT-IT in funzione dell'età. La linea di regressione lineare è indicata da una linea rossa

Risposta IFN- γ agli antigeni specifici di MTB

La distribuzione dei valori di risposta IFN- γ agli antigeni specifici di MTB del test QFT-IT, sottratti del controllo negativo, è riportata in figura 27.

L'analisi di regressione lineare ha dimostrato un andamento statisticamente significativo della risposta IFN- γ agli antigeni specifici di MTB all'aumentare dell'età ($p=0.0033$), anche se di bassa entità (ρ di Spearman= $0,1293$). Questa evidenza conferma l'andamento crescente dei risultati positivi del test QFT-IT all'aumentare delle fasce di età già riportato in figura 20 A.

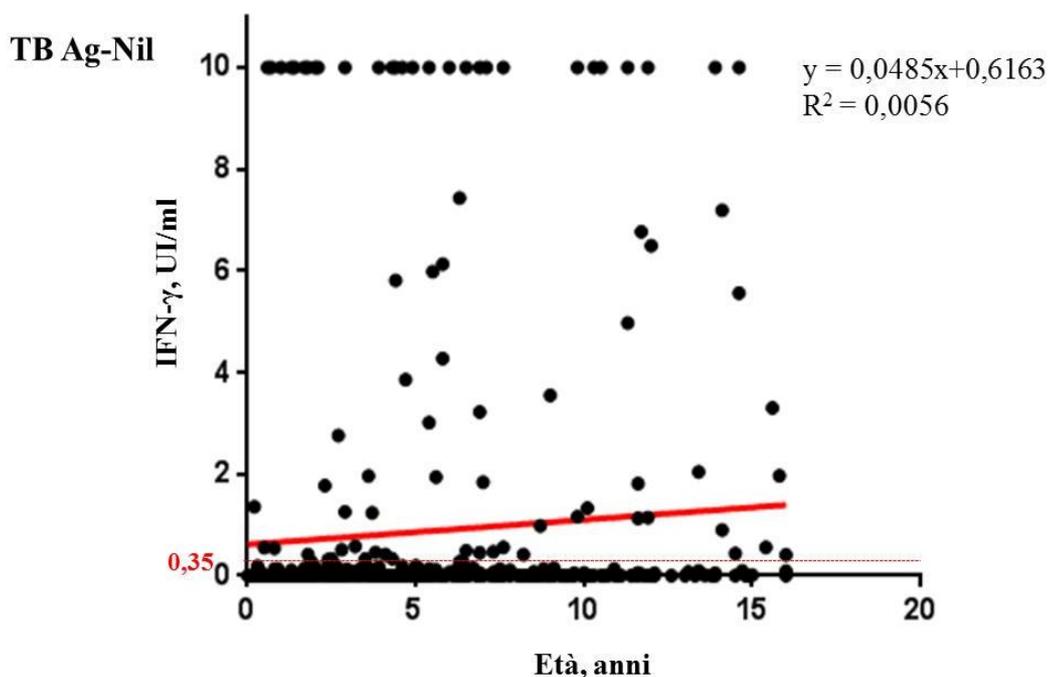


Figura 27 Analisi di regressione lineare della risposta IFN- γ al TB Antigen del test QFT-IT, sottratta del controllo negativo, in funzione dell'età. La linea di regressione lineare è indicata da una linea rossa, il valore di cut-off a 0,35 UI/ml per la positività del test è rappresentato da una linea rossa punteggiata

Risposta IFN- γ al Mitogeno

Per studiare gli effetti dell'età sulla reattività del sistema immunitario, è stata eseguita un'analisi quantitativa della capacità di rispondere allo stimolo della fitoemoagglutinina contenuto nel controllo positivo del test QFT-IT in funzione dell'età.

L'analisi di regressione lineare tra i valori di IFN- γ prodotti in risposta al Mitogeno, sottratto del *background*, e l'età ha dimostrato che tali valori crescono in maniera statisticamente significativa al crescere dell'età, come confermato dalla correlazione positiva ($p=0,0002$, rho di Spearman=0,167) riportata in figura 28. Tale evidenza riflette la progressiva maturazione del sistema immunitario dei bambini. Tuttavia, la maggior parte dei valori di risposta IFN- γ al Mitogeno si dispone al di sopra del cut-off per il risultato indeterminato del test QFT-IT, come già descritto dalla bassa percentuale di risultati indeterminati in tutte le fasce di età (figura 20 A).

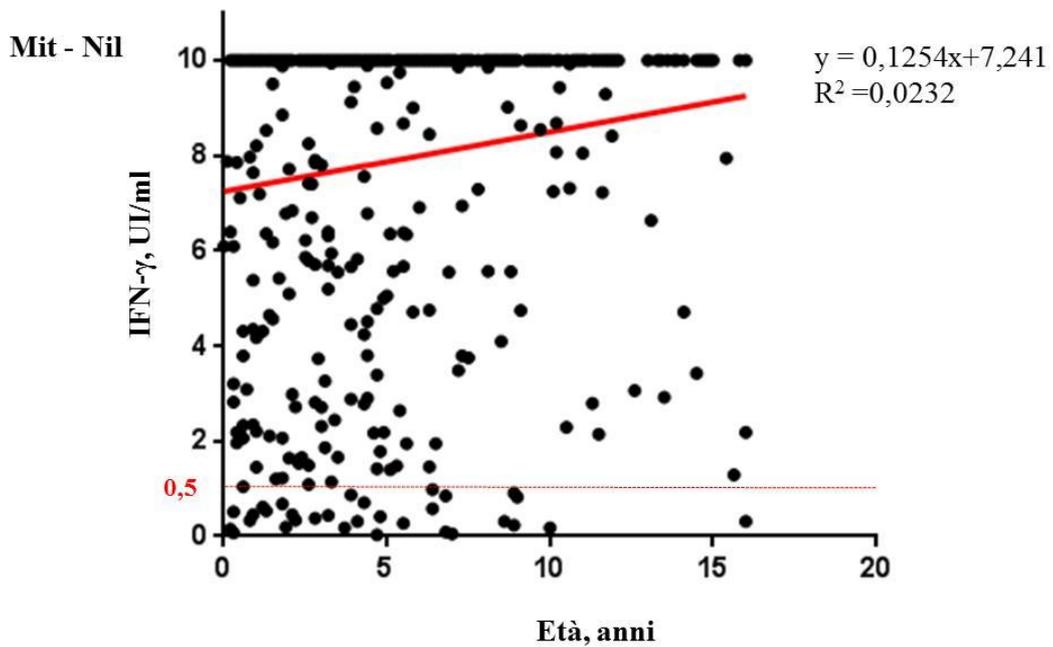


Figura 28 Analisi di regressione lineare della risposta IFN γ al Mitogeno del test QFT-IT, sottratta del controllo negativo, in funzione dell'età. La linea di regressione lineare è indicata da una linea rossa, il valore di cut-off a 0,5 UI/ml per il risultato indeterminato del test è rappresentato da una linea rossa punteggiata

5 Discussione

La diagnosi di infezione tubercolare nei bambini viene posta sulla base di sintomi clinici, evidenze radiologiche, dati epidemiologici, fattori di rischio come il contatto con un caso di TB attiva, analisi batteriologiche e risultati dei test immunologici TCT e IGRA.

Sebbene il TCT sia ancora ampiamente utilizzato nella pratica clinica, esso presenta molti limiti, quali la riproducibilità variabile, la bassa specificità e la cross-reattività con infezioni da micobatteri non-tubercolari e con la vaccinazione con BCG.

E' stato dimostrato che i test IGRA hanno una maggiore specificità nei soggetti vaccinati con BCG e nella maggior parte dei casi di micobatteriosi, evitando in questo modo inutili trattamenti.^{64,65,67,79} Tuttavia, sebbene l'uso del test Quantiferon-TB Gold In-Tube, uno dei test IGRA attualmente in commercio, sia ampiamente accettato negli adulti, alcune incertezze persistono riguardo alla sua applicazione nei pazienti pediatrici a causa del loro sistema immunitario immaturo. Inoltre, diversi studi riportano percentuali discrepanti di risultati indeterminati.^{64,80} Le quantità crescenti di dati che analizzano le performance del test QFT-IT in questa popolazione vulnerabile suggeriscono che tale test è più accurato del TCT come strumento di supporto per la diagnosi di TB nei bambini, grazie alla maggiore specificità e alla presenza di un controllo della reattività immunitaria.^{64,81} Questo studio analizza le performance del test QFT-IT e la sua concordanza con il TCT in una coorte di 517 bambini da 0 a 16 anni sottoposti allo screening per sospetta TB attiva, durante il *contact tracing*, per la recente immigrazione da aree endemiche per TB o durante lo screening pre-terapia immunosoppressiva.

La concordanza totale tra i 2 test è stata elevata per la maggior parte dei bambini risultati QFT-/TCT-, come previsto in un Paese a bassa endemia tubercolare. Tuttavia, la concordanza tra i test è risultata modesta per i bambini nati in un Paese endemico per TB e recentemente immigrati in Italia; in questo gruppo la maggior parte dei risultati discordanti era QFT-/TCT+. Ulteriori analisi di questo gruppo di pazienti hanno mostrato che il 95% di essi era stato vaccinato con BCG. Questo risultato era coerente con la bassa concordanza (41,7%) rilevata quando i risultati sono stati analizzati in base allo stato di vaccinazione con BCG: 20 su 36 bambini hanno avuto un risultato discordante QFT-/TCT+. Questi risultati sono in accordo con la bassa specificità del TCT ampiamente riportata nei bambini vaccinati con BCG.^{30,31}

La concordanza totale non è risultata diversa nelle quattro fasce di età, con la percentuale di risultati concordanti QFT+/TCT+ crescente all'aumentare dell'età, come atteso poichè i bambini più grandi hanno maggiori probabilità di essere esposti a un caso di TB attiva.

Anche se la diagnosi di TB attiva è basata convenzionalmente sulla conferma microbiologica, i bambini solitamente presentano forme pauci-bacillari e la probabilità di conferma batteriologica è solitamente bassa. Pertanto, in questa popolazione i test TCT e QFT-IT possono avere un valore aggiunto nella diagnosi di TB attiva. In questa coorte, in base alla diagnosi la concordanza tra i test è stata moderata nei bambini con tubercolosi attiva (86,0%) e il test QFT-IT ha mostrato una sensibilità maggiore rispetto al TCT (93,3% contro 86,5%). Secondo la meta-analisi di Sollai et al, la sensibilità totale del QFT-IT per la diagnosi di TB attiva nei bambini, analizzata in relazione alla loro origine da Paesi ad alto e basso reddito, è risultata rispettivamente del 79% e 57% ed ha raggiunto l'86% e il 66%, considerando solo gli studi dove la TB era confermata microbiologicamente.⁶⁴ Una recente meta-analisi di studi che riportano l'accuratezza diagnostica del test QFT-IT e del TCT in bambini immunocompetenti con TB confermata microbiologicamente ha dimostrato che non c'erano differenze significative tra le sensibilità dei due test (89,6% per il test QFT-IT contro l'88,2% del TCT), tuttavia il test QFT-IT ha mostrato una specificità significativamente più alta a quella del TCT (95,4% contro 86,3%).⁶⁷ Anche se in questo studio sono state incluse TB confermate sia clinicamente che microbiologicamente, è stata osservata un'alta sensibilità per il test QFT-IT, vicina al limite superiore dell'intervallo di confidenza riportato da entrambe le meta-analisi. Inoltre, la sensibilità del test QFT-IT riscontrata in questo studio supera anche il limite superiore dell'intervallo di confidenza riportato nella più recente meta-analisi di Sester e collaboratori dove è stata analizzata l'accuratezza del QFT-IT per la diagnosi di TB attiva negli adulti (sensibilità totale 80%, 95% CI 75-84%).⁴⁵ In un recente lavoro, Tebruegge e collaboratori hanno riportato che le risposte IFN- γ indotte dagli antigeni specifici di MTB sono significativamente più elevate nei bambini rispetto agli adulti, suggerendo che la giovane età non influisce negativamente sulla capacità dei linfociti T di generare una risposta IFN- γ specifica per MTB.⁸² La migliore performance del QFT-IT durante l'infanzia potrebbe essere dovuta alla maggiore percentuale di linfociti nel sangue, in particolare nei bambini < 2 anni, dove costituiscono circa il 60% della conta totale leucocitaria rispetto agli adulti (30% WBC).⁸³

Proprio nel sottogruppo di bambini < 2 anni è stata osservata una differenza più significativa nella sensibilità dei due test in studio: il test QFT-IT è risultato positivo nel 100% dei casi mentre il TCT nel 57,1%. Tuttavia, questi risultati devono essere interpretati con cautela, in quanto il numero di bambini compreso nella categoria TB

attiva è limitato, e attualmente sono disponibili pochi dati in questa specifica fascia di età. Uno studio multicentrico recente condotto su un'ampia coorte di bambini < 2 anni ha riportato risultati simili con una sensibilità del test QFT-IT per la diagnosi di TB attiva del 92,4%, a supporto dell'uso di questo test anche in bambini più piccoli.⁶⁸ La specificità osservata nel nostro studio è stata elevata per entrambi i test (99,3% per il QFT-IT e 98,9% per il TCT) e più alta di quella riportata nella suddetta meta-analisi,⁶⁷ probabilmente a causa dei criteri di inclusione/esclusione scelti in questo studio. Infatti la sensibilità e la specificità sono state calcolate confrontando i bambini sintomatici nei quali è stata posta una diagnosi definitiva di TB attiva con i bambini sintomatici nei quali è stata esclusa la TB attiva; perciò la maggior parte dei pazienti vaccinati con BCG, che incidono negativamente sulla specificità del TCT, sono stati esclusi da questa analisi poiché rientravano nella categoria diagnostica dei bambini esposti a un caso di TB ma asintomatici.

L'analisi delle performance dei due test nella diagnosi di infezione tubercolare latente è ostacolata dalla mancanza di un *gold standard* e dalla definizione controversa di ITBL.⁶⁹ Nel nostro studio la discordanza maggiore tra i test nei bambini con una diagnosi finale di esposizione senza infezione era dovuto a risultati QFT-/TCT+, mentre il disaccordo tra i bambini con diagnosi di ITBL era dovuto principalmente a risultati QFT+/TCT-. Per porre diagnosi di ITBL il medico basa la decisione finale sul rischio di esposizione, sullo stato di vaccinazione e sulla dimensione della reazione al TCT. Anche se questa classificazione potrebbe essere stata influenzata dal parere del medico, 34 su 38 bambini (89,5%) diagnosticati come ITBL e risultati positivi al QFT-IT, avevano almeno un fattore di rischio per l'infezione tubercolare, quali esposizione nota ad un adulto caso indice di TB, nascita in un Paese endemico per TB o con genitori nati Paese endemico per TB).

La percentuale totale di risultati indeterminati al test QFT-IT nella popolazione in studio è stata bassa (3,9%). Questo risultato è coerente con gli studi precedenti che analizzavano ampie coorti di bambini, con percentuali di risultati indeterminati tra 0 e 4,2%.^{64,68,76,77,84,85} Gli studi riguardanti pazienti pediatrici che presentano percentuali maggiori (da 14 a 35%) di risultati indeterminati includono generalmente più pazienti immunocompromessi.^{66,86,87,88} Nel nostro studio i risultati indeterminati erano principalmente associati alle diagnosi di infezioni acute non tubercolari. In particolare, il 35% dei casi indeterminati era rappresentato da casi di polmonite, in accordo con altri studi.^{64,88,89} Un recente articolo di Jeljely e collaboratori ha dimostrato che una bassa produzione di IFN- γ in risposta al Mitogeno nei bambini immunocompetenti con altre malattie infettive concomitanti, come la polmonite, è accompagnato da un'alterata risposta immunitaria di tipo Th1, Th2, Th17.⁹⁰ Inoltre, in questo studio non

sono state osservate differenze di risultati indeterminati è stato osservato tra i gruppi di età.

Dal punto di vista quantitativo la dispersione lineare dei valori di IFN γ in risposta al Mitogeno in funzione dell'età ha evidenziato che tali valori tendono a crescere con l'aumentare dell'età, suggerendo che tale risposta è significativamente influenzata dall'età del paziente, come già riportato da studi precedenti.^{80,91,92}

Tuttavia i valori di IFN γ in risposta al Mitogeno sono risultati alti anche nei bambini di età inferiore ai 2 anni, come confermato da un basso numero di risultati indeterminati in questo sottogruppo, quindi i nostri dati suggeriscono che nei bambini il sistema immunitario non è compromesso nella sua capacità di produrre una risposta immunitaria sufficiente a garantire un risultato determinato al test QFT-IT. Pertanto non emergono elementi che sconsiglino l'impiego del test nella popolazione pediatrica.

I risultati di questo lavoro sono limitati dalla natura retrospettiva dello studio, dal numero relativamente piccolo di bambini esposti a casi di TB attiva o con diagnosi finale di TB attiva e dal ridotto numero di bambini < 2 anni. Saranno necessari ulteriori studi prospettici sui bambini, soprattutto neonati, per chiarire le performance del QFT-IT in età pediatrica.

In conclusione, questo studio suggerisce che il test QFT-IT si comporta meglio del TCT nella diagnosi di infezione tubercolare latente nei bambini, soprattutto in quelli vaccinati con BCG. L'uso del QFT-IT in questa categoria di pazienti permette di ridurre il numero di bambini che ricevono una profilassi inutile. D'altra parte, 11 bambini sottoposti allo screening perché contatti di un caso di TB attiva sono risultati positivi al QFT-IT e negativi per TCT quindi sarebbero stati diagnosticati come non infetti se il TCT fosse stato l'unico test diagnostico a disposizione, aumentando il rischio di progressione verso la malattia attiva a causa di una mancata profilassi. I nostri risultati sono in accordo con le recenti raccomandazioni prodotte dalle società scientifiche italiane di pediatria riguardo alla gestione di bambini esposti a un caso di TB attiva, che suggeriscono l'utilizzo degli IGRA nei soggetti vaccinati con BCG o come conferma di un TCT positivo.⁷¹

Anche se nessuno dei due test può distinguere da solo la tubercolosi attiva da quella latente, i nostri risultati dimostrano che il QFT-IT ha una sensibilità maggiore rispetto al TCT per la diagnosi di TB attiva nei bambini piccoli. Tuttavia dalla valutazione della risposta IFN- γ agli antigeni specifici di MTB non è emerso un valore quantitativo del TB Antigen significativamente diverso tra i bambini con diagnosi di TB attiva e quelli con ITBL tale da discriminare tra le due diagnosi. A tal fine, la nuova generazione del test QFT-IT, Quantiferon-TB Plus, in grado di stimolare sia i linfociti T CD4+ che i CD8+ grazie alla presenza di un tubo aggiuntivo con antigeni

specifici di MTB, si propone di individuare quei soggetti esposti più di recente a MTB quindi a maggior rischio di progressione verso la malattia, per migliorare la sensibilità nella diagnosi di TB attiva.^{93,94}

Infine, la bassa percentuale di risultati indeterminati al test QFT-IT dimostra che nella pratica clinica le preoccupazioni relative all'utilizzo di tale test nei bambini a causa del loro sistema immunitario immaturo non ne limitano l'uso.

Pertanto, questo studio incoraggia l'uso preferenziale del test QFT-IT come strumento di supporto per la diagnosi e la gestione della tubercolosi in una popolazione a rischio quale quella pediatrica.

6 Bibliografia

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva, Switzerland. 2015 [www.who.int/tb/publications/global report/en]
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2016. Stockholm, Denmark. 2016 [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/ecdc-tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2016.pdf]
3. Dipartimento della Prevenzione del Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Agenzia Sanitaria e Sociale della Regione Emilia-Romagna. Rapporto La tubercolosi in Italia Anno 2008. Roma, Italy. 2010 [http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1222_allegato.pdf]
4. Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale della Regione Emilia-Romagna. Epidemiologia della tubercolosi in Emilia-Romagna 2010-11. Bologna, Italy. 2013 [http://assr.regione.emilia-romagna.it/it/servizi/pubblicazioni/rapporti-documenti/epidemiologia-della-tubercolosi-in-emilia-romagna-2010-2011-1]
5. Lombardi G, Dal Monte P, Denicolò A, Tadolini M, Martelli G, Bacchi Reggiani ML, Viale P, Landini MP. Trend of microbiologically-confirmed tuberculosis in a low-incidence setting with high immigration rates. BMC Public Health. 2014;14:340
6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia medica. Elsevier, 6^a edizione. 2010
7. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. Curr Opin Chem Biol. 1997;1:579-88
8. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem. 1995;64:29-63
9. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis (Edimb). 2003;83:91-7
10. Tortoli E, Piersimoni C, Scarparo C, Cirillo DM, Frizzera E. Micobatteriologia clinica. CEA Selecta medica, 2^a edizione. 2013
11. Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. Harrison, Principi di medicina interna. Mc Graw Hill, 14^a edizione. 1998
12. Braunwald E, Fauci A, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison's principle of internal medicine. Mcgraw Hill, 17^a edizione. 2009

13. Moroni M, Esposito R, De Lalla F. *Malattie infettive*. Masson, 6^a edizione. 2003
14. Kaufmann SH. New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis*. 2004;63 Suppl 2:ii50–ii56
15. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins e Cotran, Le basi patologiche delle malattie*. Masson, 8^a edizione. 2010
16. Abdul Rahaman JA, Ker HB, Yusof M, Hanafi NS, Wong JL. Tuberculosis in adults. *Malays Fam Physician*. 2014;9:34-7
17. Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N. Functional signatures of human CD4 and CD8 T cell responses to mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*. 2014;5:180
18. Hunter RL. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis (Edimb)*. 2011;91:497-509
19. Piccini P, Chiappini E, Tortoli E, de Martino M, Galli L. Clinical peculiarities of tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2014;14 Suppl 1:S4
20. Burrill J, Williams CJ, Bain G, Conder G, Hine AL, Misra RR. Tuberculosis: a radiologic review. *Radiographics*. 2007;27:1255-73
21. Yang Z, Kong Y, Wilson F, Foxman B, Fowler AH, Marrs CF, Cave MD, Bates JH. Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2004;38:199-205
22. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3578-82
23. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, Allen J, Tahirli R, Blakemore R, Rustomjee R, Milovic A, Jones M, O'Brien SM, Persing DH, Ruesch Gerdes S, Gatuzzo E, Rodrigues C, Alland D, Perkin MD. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*. 2010; 363:1005-15
24. Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4138-41
25. Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, Mazzola E, Dal Monte P, Pascarella M, Borroni E, Mondo A, Piana F, Scarparo C, Coltella L, Lombardi G, Cirillo DM. Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Eur Respir J*. 2012;40:442-7
26. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, Gler MT, Blakemore R, Worodria W, Gray C, Huang L, Caceres T, Mehdiyev R, Raymond L, Whitelaw A, Sagadevan K, Alexander H, Alland D, Perkins MD. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF

- test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet*. 2011;377:1495-1505
27. Iram S, Zeenat A, Hussain S, Wasim Yusuf N, Aslam M. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - Report from a developing country. *Pak J Med Sci*. 2015;31:105-10
 28. Shrestha P, Arjyal A, Caws M Prajapati KG, Karkey A, Dongol S, Pathak S, Prajapati S, Basnyat B. The application of GeneXpert MTB/RIF for smear-negative tb diagnosis as a fee-paying service at a South Asian general hospital. *Tuberc Res Treat*. 2015;2015:102430
 29. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993;17:968-75
 30. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax*. 2002;57:804-9
 31. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;100:1192-1204
 32. Piñeiro R, Mellado MJ, Cilleruelo MJ, García-Ascaso M, Medina-Claros A, García-Hortelano M. Tuberculin skin test in bacilli Calmette-Guérin-vaccinated children: how should we interpret the results? *Eur J Pediatr*. 2012;171:1625-32
 33. Sester M, Sester U, Clauer P, Heine G, Mack U, Moll T, Sybrecht GW, Lalvani A, Köhler H. Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2004;65:1826-34
 34. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6:413-22
 35. Marais BJ, Pai M. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child*. 2007;92:446-52
 36. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*. 2007;146:340-354. Erratum in: *Ann Intern Med*. 2007;146:688
 37. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, Lange C, Losi M, Markova R, Migliori GB, Nienhaus A, Ruhwald M, Wagner D, Zellweger JP, Huitric E, Sandgren A, Manissero D. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection: A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011;371:88-99

38. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:3-20
39. Richeldi L, Losi M, Cerri S, Casali L, Fabbri LM, Ferrara G. Using ELISpot technology to improve the diagnosis of tuberculosis infection: from the bench to the T-SPOT.TB assay. *Expert Rev Resp Med.* 2008;2:253-60
40. Bartu V, Havelkova M, Kopecka EJ. QuantiFERON-TB Gold in the diagnosis of active tuberculosis. *Int Med Res.* 2008;36:434-7
41. Kim EY, Lim JE, Jung JY, Son JY, Lee KJ, Yoon YW, Park BH, Moon JW, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Kang YA. Performance of the tuberculin skin test and interferon-gamma release assay for detection of tuberculosis infection in immunocompromised patients in a BCG-vaccinated population. *BMC Infect Dis.* 2009;9:207
42. Diel R, Loddenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A. Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis: an update. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:88-95
43. Dai Y, Feng Y, Xu R, Xu W, Lu W, Wang J. Evaluation of interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis: an updated meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31:3127-37
44. Lavender TW, Barrett A, Magee J, Ong EL. Interferon- γ release assays in the diagnosis of active tuberculosis disease in a low-incident setting: a 5-year review of data. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:1078-81
45. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, Bossink A, Dheda K, Diel R, Dominguez J, Lipman M, Nemeth J, Ravn P, Winkler S, Huitric E, Sandgren A, Manissero D. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2011;37:100-11
46. Azghay M, Bouchaud O, Mechaï F, Nicaise P, Fain O, Stirnemann J. Utility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in adult, pulmonary and extrapulmonary, active tuberculosis diagnosis. *Int J Infect Dis.* 2016;44:25-30
47. Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, Cattamanchi A, Huang L, Hopewell PC, Pai M. Interferon- γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 4:S1120-9
48. Galli L, Lancellata L, Tersigni C, Venturini E, Chiappini E, Bergamini BM, Codifava M, Venturelli C, Tosetti G, Marabotto C, Corsi L, Boccuzzi E, Garazzino S, Tovo PA, Pinon M, Le Serre D, Castiglioni L, Lo Vecchio A, Guarino A,

- Bruzzese E, Losurdo G, Castagnola E, Bossi G, Marseglia GL, Esposito S, Bosis S, Grandolfo R, Fiorito V, Valentini P, Buonsenso D, Domenici R, Montesanti M, Salvini FM, Riva E, Dodi I, Maschio F, Abbagnato L, Fiumana E, Fornabaio C, Ballista P, Portelli V, Bottone G, Palladino N, Valenzise M, Vecchi B, Di Gangi M, Lupi C, Villani A, de Martino M. Pediatric Tuberculosis in Italian Children: Epidemiological and Clinical Data from the Italian Register of Pediatric Tuberculosis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6)
49. Odone A, Riccò M, Morandi M, Borrini BM, Pasquarella C, Signorelli C. Epidemiology of tuberculosis in a low-incidence Italian region with high immigration rates: Differences between not Italy-born and Italy-born TB cases. *BMC Public Health* 2011, 11, 376
50. Seddon, JA, Shingadia, D. Epidemiology and disease burden of tuberculosis in children: A global perspective. *Infect Drug Resist.* 2014;7:153-65
51. Principi N, Galli L, Lancella L, Tadolini M, Migliori GB, Villani A, Esposito S; Italian Pediatric TB Study Group. Recommendations Concerning the First-Line Treatment of Children with Tuberculosis. *Paediatr Drugs.* 2016;18:13-23
52. Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann B. Paediatric tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2008;8:498-510
53. Rigouts L. Clinical practice: diagnosis of childhood tuberculosis. *Eur J Pediatr.* 2009;168:1285-1290
54. Kumar MK, Kumar P, Singh A. Recent advances in the diagnosis and treatment of childhood tuberculosis. *J Nat Sci Biol Med.* 2015;6:314-20
55. Berti E, Galli L, Venturini E, de Martini M, Chiappini E. Tuberculosis in childhood: a systematic review of national and international guidelines. *BMC Infect Dis.* 2014;14: Suppl 1:S3
56. Al-Aghbari N, Al-Sonboli N, Yassin MA, Coulter JB, Atef Z, Al-Eryani A, Cuevas LE. Multiple sampling in one day to optimize smear microscopy in children with tuberculosis in Yemen. *PLoS One.* 2009;4:e5140
57. Luis E. Cuevas. The Urgent Need for New Diagnostics for Symptomatic Tuberculosis in Children. *Indian J Pediatr.* 2011;78:449-455
58. Giang do C, Duong TN, Ha DT, Nhan HT, Wolbers M, Nhu NT, Heemskerk D, Quang ND, Phuong DT, Hang PT, Loc TH, Lan NT, Dung NH, Farrar J, Caws M. Prospective evaluation of GeneXpert for the diagnosis of HIV-negative pediatric TB cases. *BMC Infect Dis.* 2015;15:70
59. Cannas A, Goletti D, Girardi E, Chiacchio T, Calvo L, Cuzzi G, Piacentini M, Melkonyan H, Umansky SR, Lauria FN, Ippolito G, Tomei LD. Mycobacterium tuberculosis DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:146-51

60. Petrucci R, Lombardi G, Corsini I, Visciotti F, Pirodda A, Cazzato S, Landini MP, Dal Monte P. Use of transrenal DNA for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis in children: a case of tubercular otitis media. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:336-38
61. Machingaidze S, Wiysonge CS, Gonzalez-Angulo Y, Hatherill M, Moyo S, Hanekom W, Mahomed H. The utility of an interferon gamma release assay for diagnosis of latent tuberculosis infection and disease in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:694-700
62. Sun L, Xiao J, Miao Q, Feng WX, Wu XR, Yin QQ, Jiao WW, Shen C, Liu F, Shen D, Shen AD. Interferon gamma release assay in diagnosis of pediatric tuberculosis: a meta-analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63:165-173
63. Cruz AT, Starke JR, Lobato MN. Old and new approaches to diagnosing and treating latent tuberculosis in children in low-incidence countries. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26:106-113
64. Sollai S, Galli L, de Martino M, Chiappini E. Systematic review and meta-analysis on the utility of interferon-gamma release assays for the diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection in children: A 2013 update. *BMC Infect Dis.* 2014;14:Suppl 1
65. Chiappini E, Bonsignori F, Mazzantini R, Sollai S, Venturini E, Mangone G, Cortimiglia M, Olivito B, Azzari C, Galli L, de Martino M. Interferon-gamma release assay sensitivity in children younger than 5 years is insufficient to replace the use of tuberculin skin test in western countries. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33:1291-93
66. Hausteil T, Ridout DA, Hartley JC, Thaker U, Shingadia D, Klein NJ, Novelli V, Dixon GL. The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon-gamma release assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children correlates with age and immune status. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28:669-73
67. Laurenti P, Raponi M, de Waure C, Marino M1, Ricciardi W, Damiani G. Performance of interferon- γ release assays in the diagnosis of confirmed active tuberculosis in immunocompetent children: a new systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2016;16:131
68. Garazzino S, Galli L, Chiappini E, Pinon M, Bergamini BM, Cazzato S, Dal Monte P, Dodi I, Lancella L, Esposito S, Iughetti L, Montagnani C, De Martino M, Tovo PA; SITIP IGRA Study Group. Performance of interferon- γ release assay for the diagnosis of active or latent tuberculosis in children in the first 2 years of age: a multicenter study of the Italian Society of Pediatric Infectious Diseases. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33:e226-31

69. Sali M, Buonsenso D, Goletti D, D'Alfonso P, Zumbo A, Fadda G, Sanguinetti M, Delogu G, Valentini P. Accuracy of QuantiFERON-TB Gold Test for Tuberculosis Diagnosis in Children. *PLoS One*. 2015;10:e0138952
70. Pollock L, Basu RR, Kampmann B. How to use: interferon γ release assays for tuberculosis. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98:99-105
71. Lancella L, Lo Vecchio A, Chiappini E, Tadolini M, Cirillo D, Tortoli E, de Martino M, Guarino A, Principi N, Villania A, Esposito E, Galli L, for the Italian Pediatric TB Study Group. How to manage children who have come into contact with patients affected by tuberculosis. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2015;1-12
72. BBL MGIT package insert, Becton Dickinson, USA [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/brochures/br_0_222777.pdf]
73. Xpert MTB/RIF package insert, Cepheid, USA [<http://www.cepheid.com/manageddownloads/xpert-mtb-rif-english-package-insert-301-1404-rev-c.pdf>]
74. QuantiFERON-TB Gold ELISA Package insert. Cellestis, a Qiagen company, Germany [<http://www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/2PK/UK.pdf>]
75. American Academy of Pediatrics. Tuberculosis. In: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS. *Red Book: 2015 Report of the Committee on Infectious Diseases*. American Academy of Pediatrics, 30a edizione. 2015:810-53
76. Bianchi L, Galli L, Moriondo M, Veneruso G, Becciolini L, Azzari C, Chiappini E, de Martino M. Interferon-gamma release assay improves the diagnosis of tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:510-14
77. Critselis E, Amanatidou V, Syridou G, Spyridis NP, Mavrikou M, Papadopoulos NG, Tsolia MN. The effect of age on whole blood interferon-gamma release assay response among children investigated for latent tuberculosis infection. *J Pediatr*. 2012;161:632-38
78. World Health Organization. Tuberculosis country profiles, Geneva: World Health Organization; 2015 [<http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/>]
79. Losi M, Bergamini BM, Venturelli C, Del Giovane C, Sighinolfi G, Rumpeneisi F, Richeldi L. Tuberculosis infection in foreign-born children: a screening survey based on skin and blood testing. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15:1182-84
80. Chiappini E, Bonsignori F, Accetta G, Boddi V, Galli L, Biggeri A, De Martino M. Interferon- γ release assays for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children: a literature review. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012;25:335-43

81. Mandalakas AM, Detjen AK, Hesselning AC, Benedetti A, Menzies D. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:1018-32
82. Tebruegge M, de Graaf H, Sukhtankar P, Elkington P, Marshall B, Schuster H, Patel S, Faust SN. Extremes of age are associated with indeterminate QuantiFERON-TB gold assay results. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2694-97
83. Kliegman RM, Stanton BMD, St Geme J, Schor NF, Behrman RE. *Nelson Textbook of Pediatrics.* Elsevier, 20a edizione. 2015
84. Jenum S, Selvam S, Mahelai D, Jesuraj N, Cárdenas V, Kenneth J, Hesselning AC, Doherty TM, Vaz M, Grewal HM. Influence of age and nutritional status on the performance of the tuberculin skin test and QuantiFERON-TB gold in-tube in young children evaluated for tuberculosis in Southern India. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33:e260-69
85. Hermansen T, Lillebaek T, Hansen AB, Andersen PH, Ravn P. QuantiFERON–TB Gold In-Tube test performance in Denmark. *Tuberculosis (Edinb).* 2014;94:616-21
86. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico R, Meccugni B, Meacci M, De Giovanni D, Rumpianesi F, Fabbri LM, Balli F, Richeldi L. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics.* 2009;123:e419-24
87. Bruzzese E, Bocchino M, Assante LR, Alessio M, Bellofiore B, Bruzzese D, Iorio R, Matarese A, Santoro G, Vajro P, Guarino A, Sanduzzi A. Gamma interferon release assays for diagnosis of tuberculosis infection in immune-compromised children in a country in which the prevalence of tuberculosis is low. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2355-57
88. Blandinières A, de Lauzanne A, Guérin-El Khourouj V, Gourgouillon N, See H, Pédrón B, Faye A, Sterkers G. QuantiFERON to diagnose infection by *Mycobacterium tuberculosis*: performance in infants and older children. *J Infect.* 2013;67:391-98
89. Debord C, De Lauzanne A, Gourgouillon N, Guérin-El Khourouj V, Pédrón B, Gaudelus J, Faye A, Sterkers G. Interferon-gamma release assay performance for diagnosing tuberculosis disease in 0- to 5-year-old children. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:995–97
90. Jeljeli M, Guérin-El Khourouj V, de Lauzanne A, Armand M, Chhor V, Pédrón B, Dager S, Viala J, Gressens P, Faye A, Sterkers G. Altered cytokine profiles in children with indeterminate quantiferon results and common infections. *J Infect.* 2015;71:250-57

91. Connell TG, Tebruegge M, Ritz N, Bryant PA, Leslie D, Curtis N. Indeterminate interferon-gamma release assay results in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29:285-86
92. Thomas B, Pugalenti A, Patel H, Woltmann G, Bankart J, Hoskyns W. Concordance between tuberculin skin test and interferon- γ assay and interferon- γ response to mitogen in pediatric tuberculosis contacts. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46:1225-32
93. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Codecasa L, Cugnata F, Dal Monte P, Di Serio C, Goletti D, Lombardi G, Lipman M, Rancoita PM, Tadolini M, Cirillo DM. First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur Respir J.* 2016;47:1587-90
94. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Campisi D, Castellotti PF, Codecasa LR, Cugnata F, Di Serio C, Ferrarese M, Goletti D, Lipman M, Rancoita PM, Russo G, Tadolini M, Vanino E, Cirillo DM. First evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus performance in contact screening. *Eur Respir J.* 2016 [Epub ahead of print]

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Carlo Garzelli, direttore della Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia dell'Università degli Studi di Pisa, per avermi dato la possibilità di svolgere il tirocinio formativo presso l'Unità Operativa di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Orsola-Malpighi di Bologna.

Ringrazio la Prof.ssa Maria Paola Landini, direttore dell'Unità Operativa di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Orsola-Malpighi di Bologna, per aver reso possibile la mia formazione nei vari ambiti della Batteriologia e della Virologia.

Ringrazio la Dott.ssa Paola Dal Monte, responsabile del laboratorio Micobatteri della suddetta Unità, per avermi inserito nel suo laboratorio e coinvolto nei progetti di ricerca che hanno portato a questi risultati.