

Diagnosi di laboratorio della tubercolosi e delle micobatteriosi

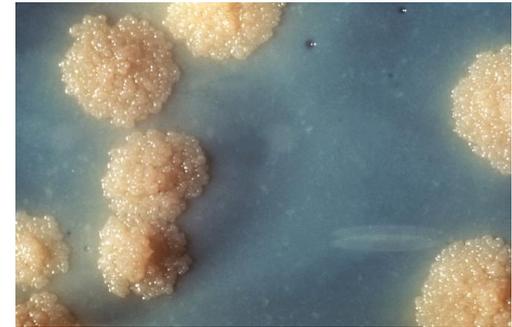
Celestino Bonura

**Dipartimento di Scienze per la
Promozione della Salute e
Materno-Infantile**

“G. D’Alessandro”

**Università degli Studi di
Palermo**

celestino.bonura@unipa.it



Immigrazione: la tubercolosi contagia i marinai. Domani i civili?

L'ultima
Ribattuta
NOTIZIE E RETROSCENA CHE I MEDIA NASCONDONO

Immigrazione, 8 militari positivi a Tbc De Giorgi: "Né malati né contagiati"

Tgcom24

SICILIA: EPIDEMIA DI TUBERCOLOSI TRA CLANDESTINI, NOTIZIA CONFERMATA DA PROTEZIONE CIVILE

E' ormai emergenza malattie infettive in Sicilia in seguito all'ondata indiscriminata di clandestini africani.

<http://voxnews.info/2014/04/17/>



SICILIA, ACCERTATI PRIMI CASI DI TUBERCOLOSI

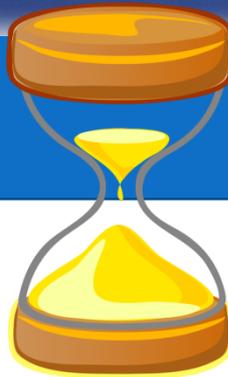
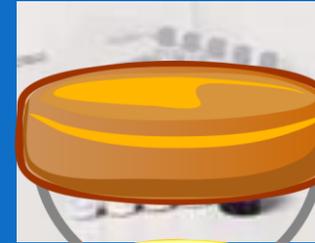
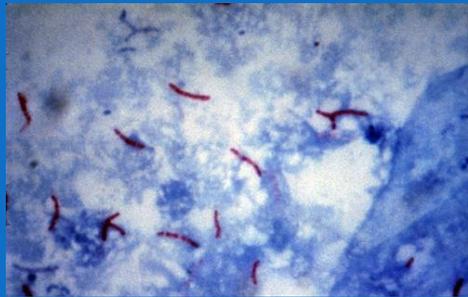
link: <http://www.evarconews.it/la-sanita-malata/>

Paura per il dilagare della Tubercolosi che viene dall'Africa: 10 militari sarebbero positivi ai test

La tubercolosi in Sicilia

Google tubercolosi Sicilia
13/06/2015

Come eravamo....



Microscopia e TB



- **Una procedura vecchia più di 100 anni**
- **Ancora valida**
- **Semiquantitativa**
- **Poco sensibile**
 - **Tipologia di campione**
 - **Età pediatrica**
- **Proxy contagiosità**
 - **Outcome**
 - **Sanità pubblica – indagine sui contatti**

Coltura

Terreno solido Lowenstein Jensen



≥ 20 gg

Terreno liquido MGIT



8 – 14 gg

Resistenza ai farmaci antiTB

- **Convenzionale**
- **Crescita/non crescita in presenza di una singola “concentrazione critica” di un farmaco**
 - **Metodo delle proporzioni in terreno solido**
 - **3-4 settimane**
 - **Tecniche basate sull'uso di terreni liquidi**
 - **BACTEC radiometrico**
 - **MGIT**
 - **ca. 7-10 gg**
 - **Kit SIRE + PYZ**
 - **Farmaci di seconda linea più problematici**

**Il laboratorio
e la
tubercolosi**

Epidemiologia

**Diagnosi
malattia**

**Diagnosi
infezione**

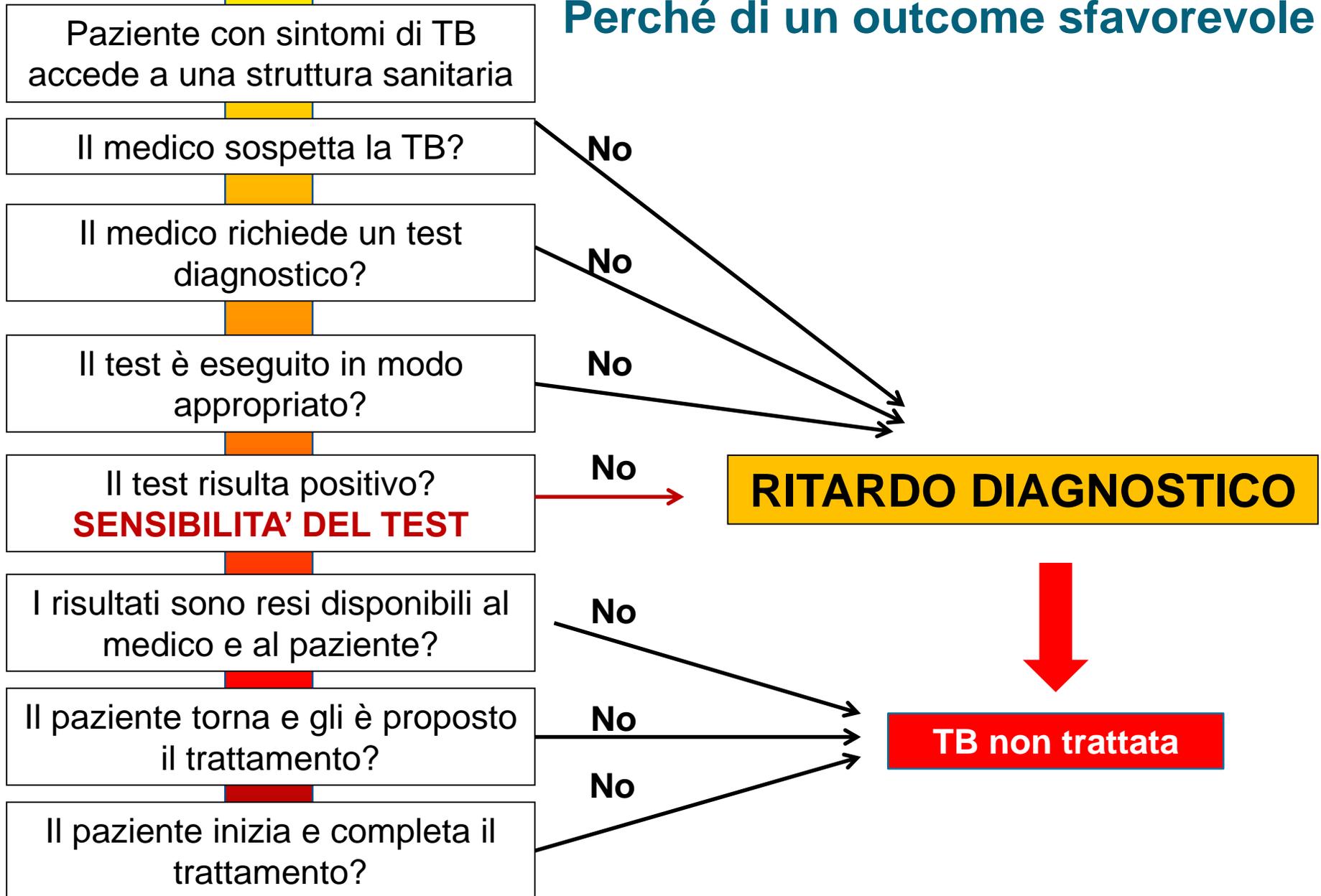
Prevenzione

**Sensibilità
antibiotici**

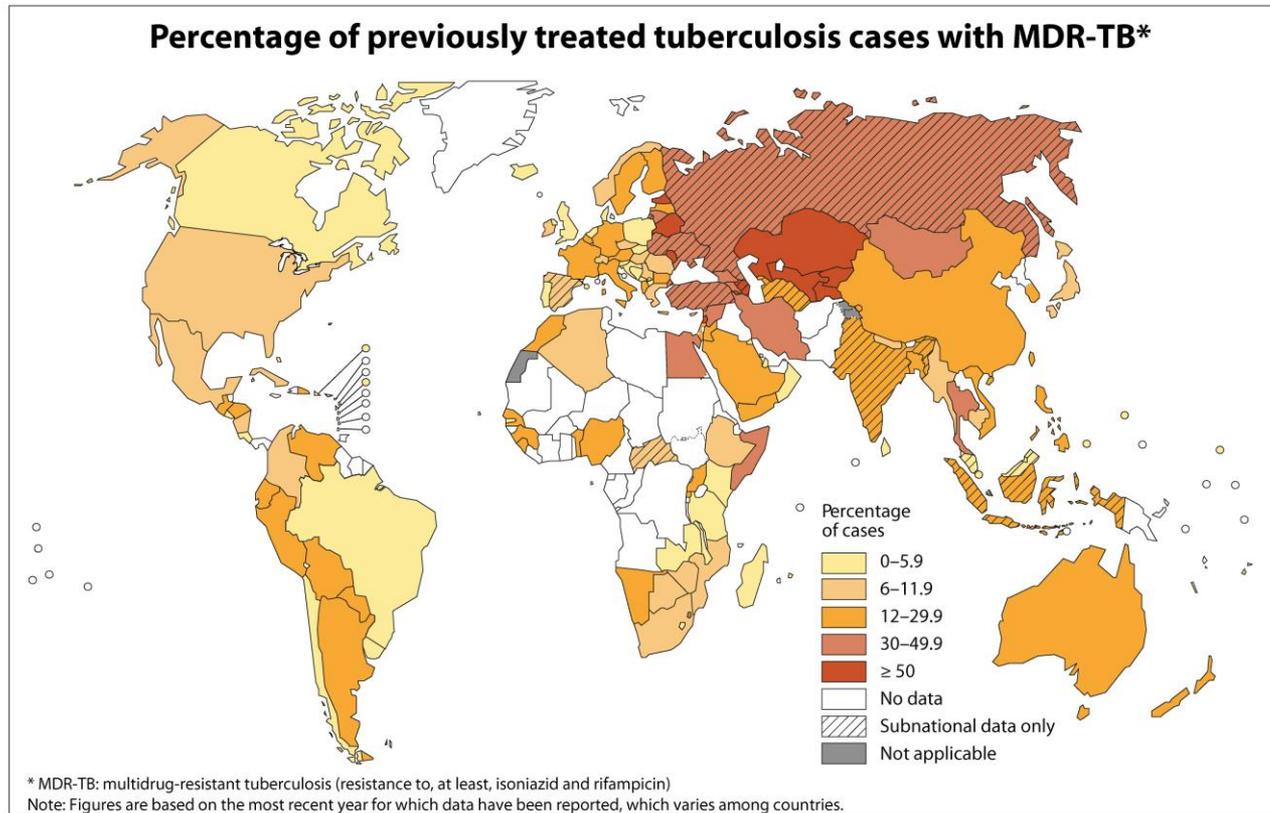
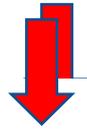
**Follow-up
terapia**

Sorveglianza

Perché di un outcome sfavorevole



MDR-TB & XDR-TB



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Source: *Global Tuberculosis Report 2012*. WHO, 2012.





Wild type

MDR

XDR

TDR

Definizioni di resistenza - WHO

MDR-TB (multidrug resistant TB) = TB causata da ceppi di MTBC resistenti almeno a **rifampicina** e **isoniazide**

Può essere il risultato di un'infezione con un ceppo MDR o può svilupparsi nel corso del trattamento

Tasso di guarigione 40 – 80% (> 90% in TB sensibile)

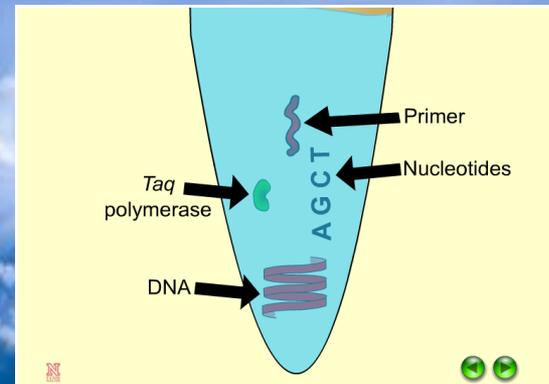
XDR-TB (extensively drug resistant TB) = TB causata da ceppi di MTBC resistenti a **rifampicina** e **isoniazide** più a un **fluorochinolone** e a uno dei farmaci iniettabili di seconda linea (**amikacina**, **capreomicina** o **kanamicina**)

Definizioni emergenti

Extremely drug resistant TB = TB causata da ceppi di MTBC resistenti a tutti i farmaci di prima e seconda linea, inclusi **tutti i fluorochinoloni** (gruppo 3 WHO) e ai **farmaci di efficacia «incerta»** (gruppo 5 WHO: clofazimina, dapsona, claritromicina, tioacetazone e linezolid).

Totally drug resistant TB = Iran (15 casi), India (4 casi), Sud Africa (diagnosi genotipica mutazioni)

PCR



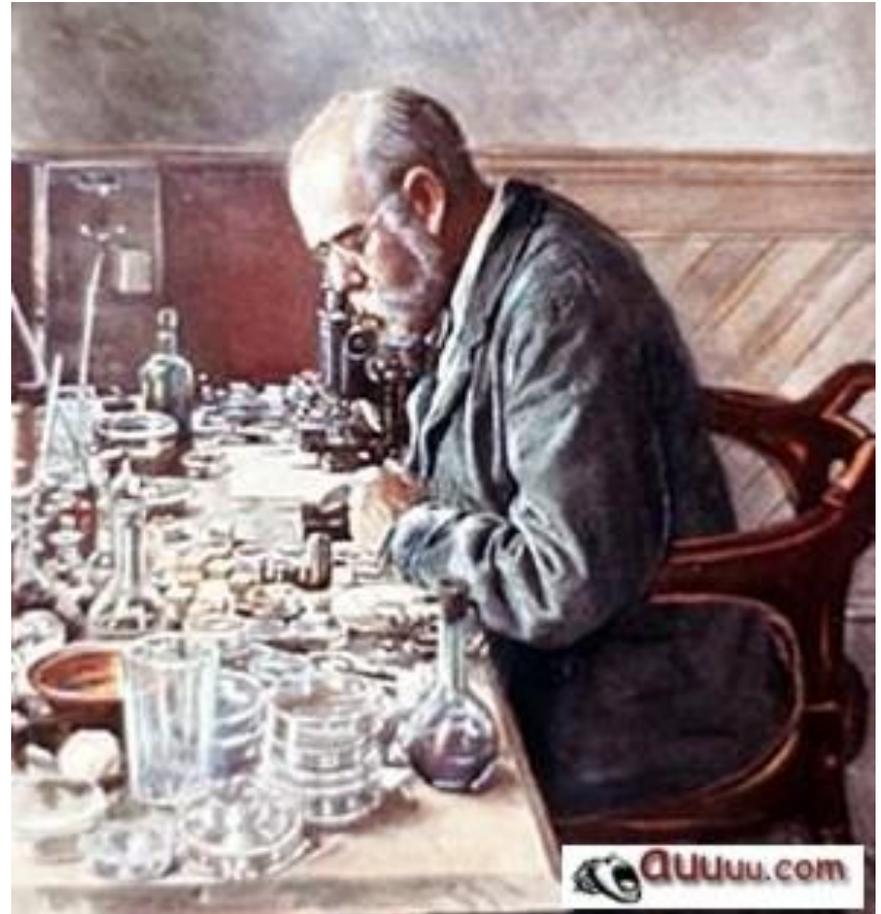
Applicazioni pratiche della diagnostica molecolare

- Nel 2009 prime linee-guida CDC su NAAT per diagnosi TB
 - almeno su un campione respiratorio per ogni paziente sospetto di TB polmonare e
 - per il quale i risultati avrebbero potuto modificare management del caso/attività di controllo
- **Aumento dei costi del laboratorio controbilanciati dal risparmio di risorse «a valle»**
 - **Ridotta trasmissione**
 - **Esito del trattamento più favorevole**



Applicazioni

- **Diagnosi**
 - “tradizionale”
 - **GeneXpert MTB/RIF**
- **Saggio di sensibilità**
- **Tipizzazione molecolare**



Tecniche diagnostiche molecolari

- **Target: DNA**
- **PCR e Realtime PCR**
 - Amplificazione sequenze target specifiche di MTBC
 - Identificazione di mutazioni associate a resistenza a isoniazide e rifampicina
 - **RIF** (sequenza target *rpoB*)
 - **INH** (sequenze target *katG* & *inhA*)

Diagnosi molecolare convenzionale

- **Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (AMTD) test (Gen-Probe Inc., San Diego, Calif.)**
- **Amplicor (Roche)**
- **BD ProbeTec Direct TB System (Becton Dickinson)**

Sensibilità	Specificità
92%	99%

Ziehl positivi	
Sensibilità	99%
Specificità	98%

Ziehl negativi	
Sensibilità	62%
Specificità	99%

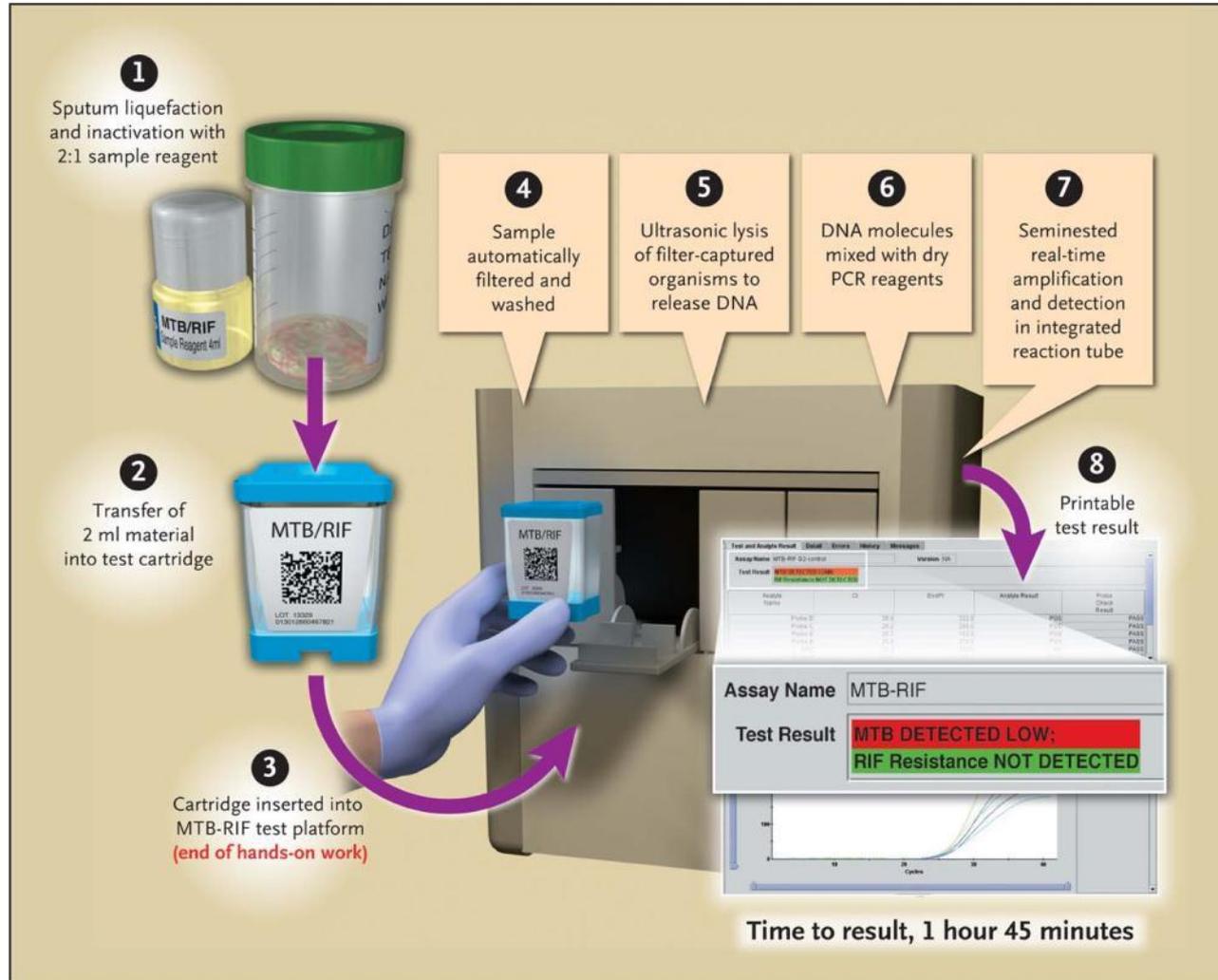
PCR vs. Real-Time PCR

- PCR per amplificare le sequenze target
 - **+**
 - Un sistema esterno per verificare presenza/assenza e caratteristiche ampliconi
 - Elettroforesi in agarosio
 - Saggi immunoenzimatici
 - Elettroforesi capillare
 - **Manipolazioni post-PCR**
 - **Rischio di contaminazione**
 - **Lenta**
 - **Expertise**
- 2 componenti
 - PCR per amplificare le sequenze target
 - Sistema di monitoraggio della PCR
 - Fluorofori-probe marcati
 - Sistema di rivelazione della fluorescenza
 - Software per registrare i dati
 - **No manipolazioni post-PCR**
 - **Veloce**
 - **PCR finita = risultati pronti**
 - **No rischio di contaminazione**

Antibiogramma “molecolare”

- *Metodi probe-based*
 - **Molecular beacon probe assay**
 - GenExpert MTB/Rif (CEPHEID)
 - **Line-probe assay**
 - HAIN MTBDR plus – Isoniazide e Rifampicina
 - HAIN MTBDR s/ – fQ, Aminoglicosidi, Etambutolo
- *Metodi sequence –based*
 - Sequenziamento tradizionale (Sanger)
 - Pyrosequencing
 - Next generation sequencing (NGS)

Cepheid GeneXpert MTB/RIF Test



The Xpert MTB/RIF Molecular Beacon Assay

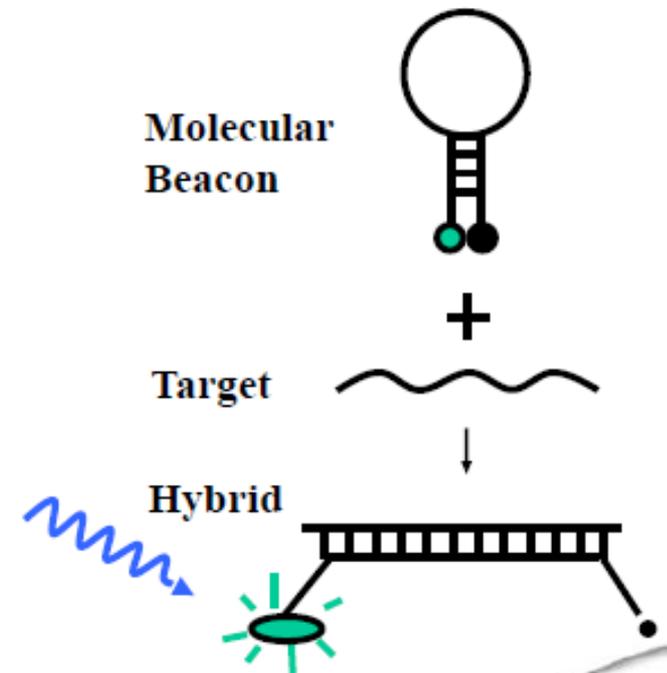
rpoB GENE 81 bp RIF RESISTANCE DETERMINING REGION



5-Probes bind to wild type (do not bind to mutant sequence)

1-Probe for SPC (*Bacillus globigii*)

6-fluorescent dyes detected simultaneously



All Common *rpoB* Mutations Detected

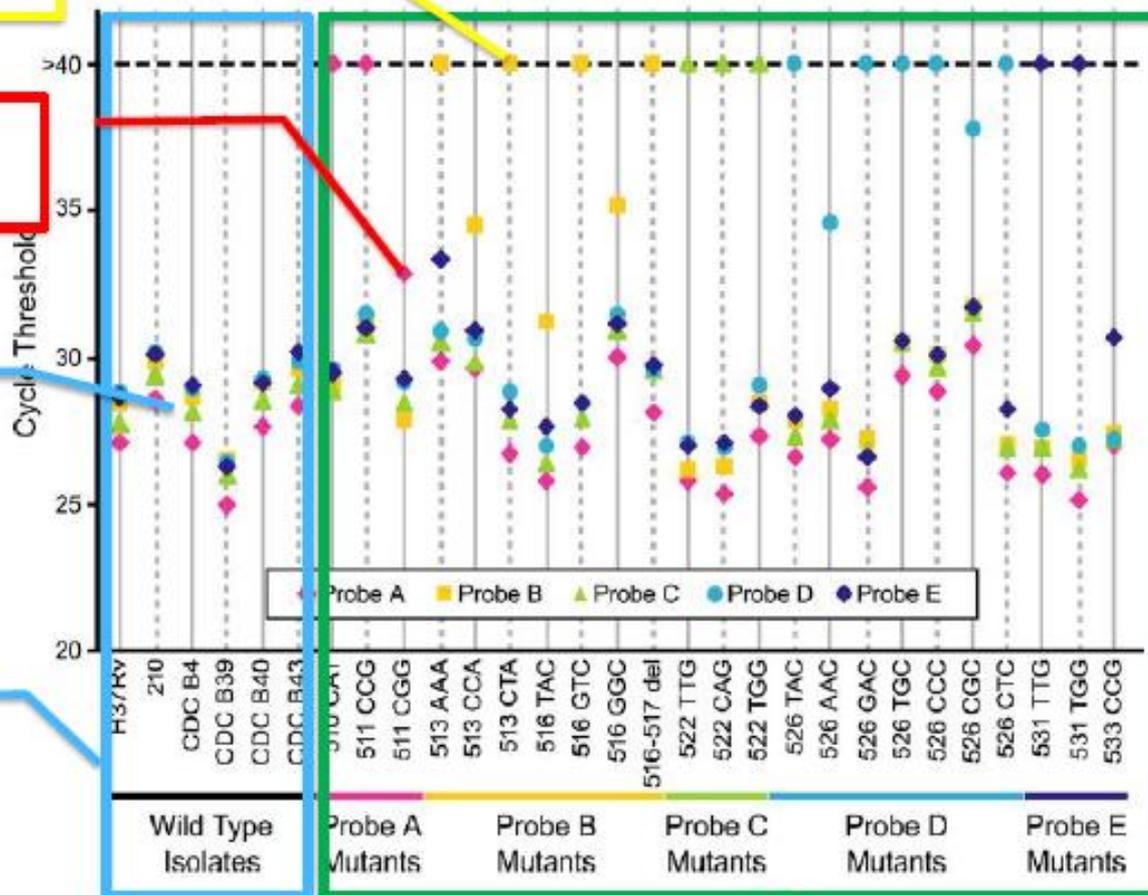
No signal from Probe B

Delayed signal from Probe A

Wild-type strains - all probe signals tightly grouped

Representative selection of wild-type strains

Xpert MTB/RIF detects the most prevalent *rpoB* mutations



Representative selection of known mutations

1

2. Shake then stand
10 minutes

4. Transfer 2ml
to cartridge

1. Add 2:1 Sample
Buffer to sample

3. Shake then stand
further 5 minutes

Begin Test...

1. Inoculate media and
prepare smear from
deposit

2. Add 1.5ml Sample
Reagent to 0.5ml
deposit

3. Shake then
stand 10 min.

5. Transfer
the 2ml to
cartridge

4. Shake then
stand
further 5
minutes

Begin Test...

2

Xpert MTB/RIF → Low Risk Biosafety level

Our results suggest that the Xpert MTB/RIF assay poses equivalent biohazard risk than the performance of a direct AFB smear ²



Direct AFB Smear Microscopy ¹

Limited risk of generating infectious aerosols

- **Work can be done on an open bench**
 - restricted access to the laboratory
 - separate bench for smear-preparation
- **Adequately ventilated laboratory**
 - 6-12 ACH, directional airflow
 - Natural or mechanical ventilation
- **Proper disposal of infectious material**

References:

1-<http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/Mtg2pres/01%20-%20Current%20draft%20WHO-CDC%20Biosafety%20recommendations.pdf>

2-Containment of Bioaerosol Infection Risk by the Xpert MTB/RIF, Banada et Al.; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2010, p. 3551-3557

Algorithm

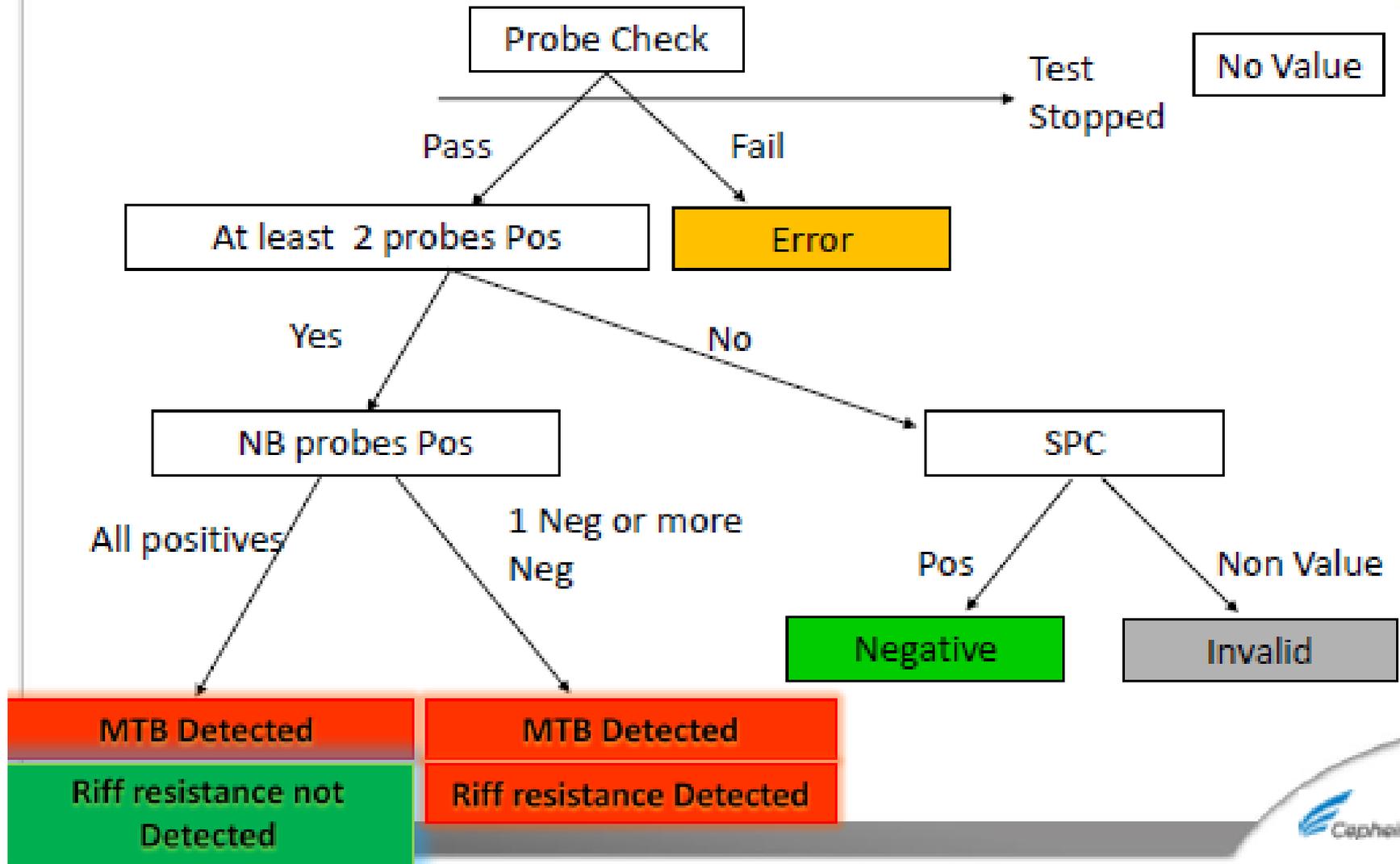
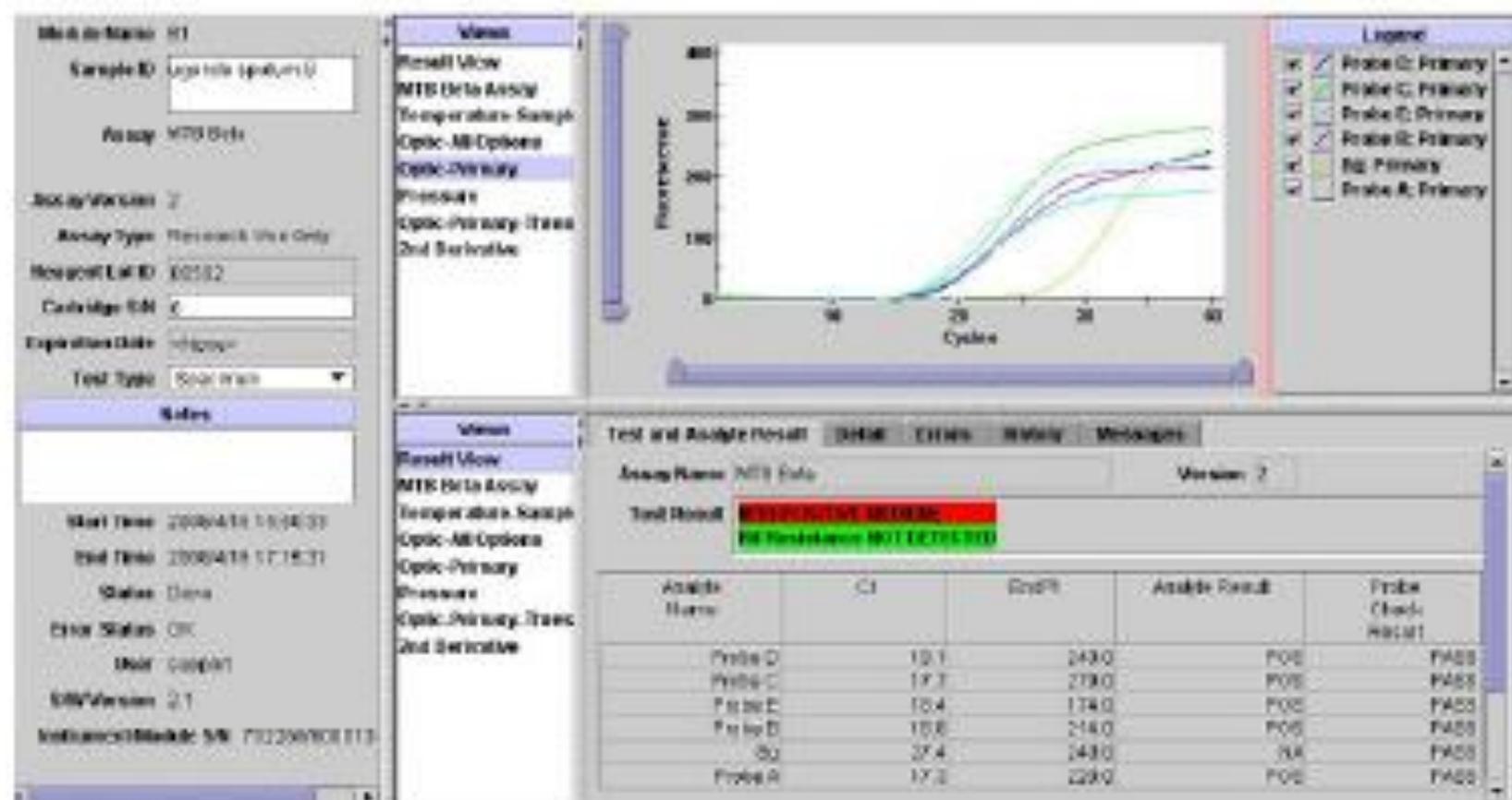


Figure 1. Readout of Xpert MTB/RIF assay for a TB positive, rifampicin-susceptible specimen. Courtesy: Karin Weyer, The WHO STOP TB Department.

Rifampin susceptible sample

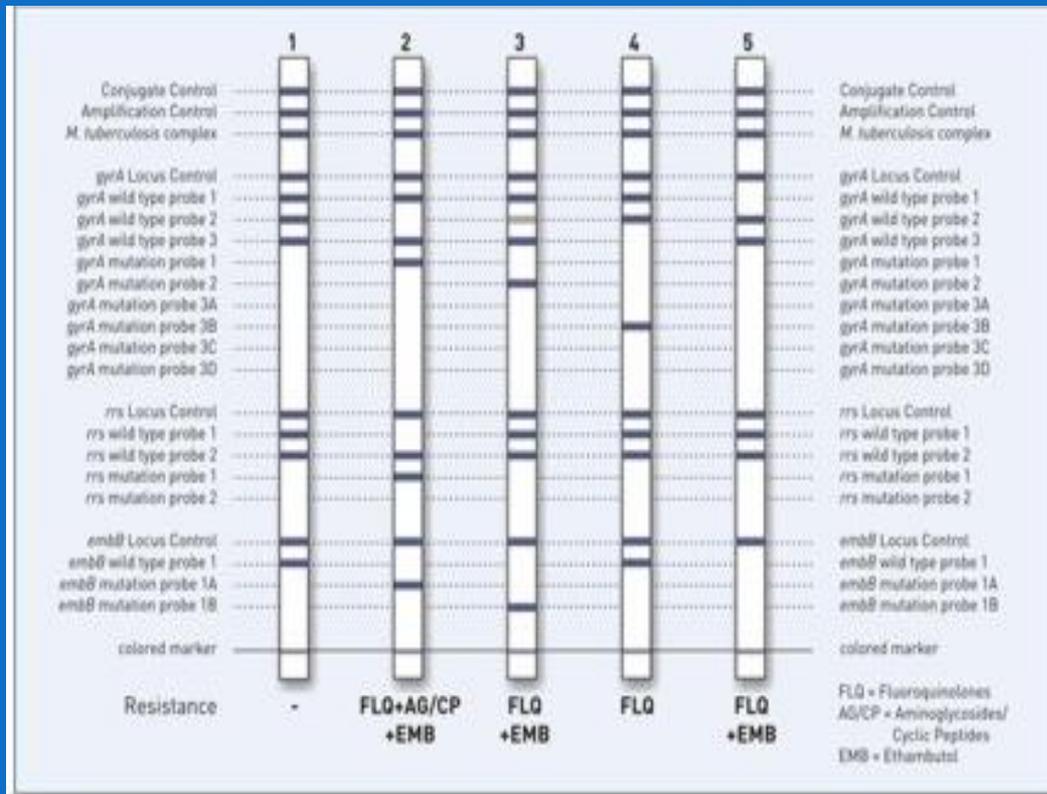
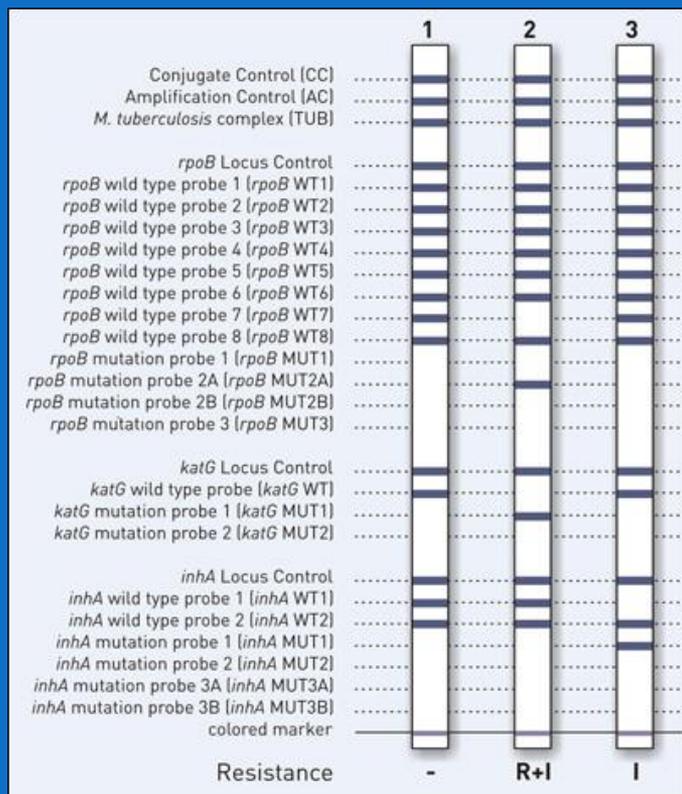


Line Probe Assay

- Target: DNA
- PCR tradizionale (NO realtime)
 - Amplificazione di sequenze target
- Reverse hybridization
 - Gli ampliconi marcati ibridano ai probe immobilizzati su membrana (strip).
- Rivelazione colorimetrica
 - Osservazione delle bande (un probe per banda)
- **Mutazione**
 - **Presenza banda corrispondente al target mutato e/o**
 - **Assenza banda profilo wild type**

Rifampicina, isoniazide

Etambutolo, FQ, aminoglicosidi/cicloserina



Geni e mutazioni associate a farmacoresistenza

Rifampin (RIF)

rpoB

TCG531TTG

Most frequent mutation in MDR TB

Associated with RIF and RFB resistance

Detectable by HAIN^a, specified

Detectable by Probe E of

GeneXpert^b, not specified

Associated with RIF and RFB resistance

CAC526TAC

CAC526GAC

Detectable by HAIN^a, specified

Detectable by Probe D of

GeneXpert^b, not specified

Often are associated with RIF resistance but RFB susceptibility

Detectable by HAIN^a, specified

Detectable by Probe B of

GeneXpert^b, not specified

Silent mutation:

TTC514TTT

Most frequent silent mutation.

Not associated with RIF or RFB resistance. Falsely interpreted as RIF-resistance by probe methods.

Detectable by HAIN^a, missing WT3, not specified

Detectable by Probe B of

GeneXpert^b, not specified

• **Incorrectly reported as "RIF resistance detected"**

Geni e mutazioni associate a farmacoresistenza

Isoniazid (INH)	<i>katG</i>	AGC315ACC	Most frequent mutation, associated with high-level INH resistance Some other mutations in codon 315: ACA, AAC, ATC, ACT, GGC
	<i>inhA</i> promoter	-15C/T	Often associated with low-level INH resistance and ethionamide resistance Some other mutations: -8T/C, -8T/A, -8T/G, -9G/T, -16A/G, -17G/T
	<i>ahpC</i> promoter	-12G/A	Compensatory to <i>katG</i> mutations; found in isolates with high-level INH resistance Some other mutations: -6C/T, -9C/T, -10G/A, -10G/T

Geni e mutazioni associate a farmacoresistenza

Ethambutol (EMB)	<i>embB</i>	ATG306GTG	<p>Most frequent mutation associated with EMB resistance</p> <p>Some other mutations in codon 306: CTG, ATA, ACG, ATT, TTG</p> <p>Not all mutations in <i>embB</i> are associated with EMB resistance</p>
Pyrazinamide (PZA)	<i>pncA</i>	No predominant mutations	<p>Widely distributed throughout the gene and the promoter</p> <p>Not all mutations are associated with PZA resistance</p>
Quinolones	<i>gyrA</i>	GAC94GGC	<p>Most frequent mutation, usually MOX MIC >1 µg/mL. MOX may still have clinical efficacy if MIC ≤2 µg/mL⁴⁹; may need to increase dosage</p> <p>Some other mutations in codon 94: TAC, CAC, GCC, AAC</p> <p>Some other mutations: TCG91CCG; GGC88GCC, GGC88TGC</p> <p>A frequent mutation. Usually MOX MIC ≤1 µg/mL. MOX may still have clinical efficacy</p>
		GCG90GTG	

Geni e mutazioni associate a farmacoresistenza

Clin Lab Med 34 (2014) 297–314
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.005>

Amikacin (AMK)	<i>rrs</i>	1401A/G	Most common mutation; associated with AMK resistance
		1402C/T	Usually not associated with AMK resistance
		1484G/T	Associated with AMK resistance
Capreomycin (CAP)	<i>rrs</i>	1401A/G	Most common mutation; usually associated with CAP resistance Some other mutations: 1402C/T, 1484G/T
		<i>tlyA</i>	No predominant mutations Mutations are widely distributed throughout the gene Some mutations are highly associated with CAP resistance: GGG196GAG, GC insertion at nucleotide 202, GT insertion at nucleotide 755
Kanamycin (KAN)	<i>rrs</i>	1401A/G	Most common mutation. Associated with KAN resistance Some other mutations: 1402C/T, 1484G/T
		<i>eis promoter</i>	-10G/A Highly associated with KAN resistance Some other mutations: -14C/T, -37G/T
Bedaquiline (BDQ)	<i>atpE</i>		Mutations in C ring of the adenosine triphosphate (ATP) synthase may be associated with BDQ resistance

Mutazioni e RIF resistenza

- **TCG531TTG**
- **CAC526GAC**
- **CAC526TAC**
 - Più comuni
 - Resistenza alto livello a RIF e RFB
- **GAC516GTC**
- **CAC526CTC**
 - Resistenza RIF
 - Sensibilità RFB

- **CTG511CCG**
- **GAC516TAC**
- **CAC526AAC**
- **CTG533CCG**
 - Risultati altamente discordanti

- **TTC514TTT**
- **GGC507GGT**
 - Mutazioni silenti

Limitazioni

- **Selezione limitata di geni e siti**
 - Alcune mutazioni possono non essere individuate
- **Resistenze emergenti in popolazioni miste possono non essere identificate**
- **Alcune mutazioni non conferiscono resistenza**
 - Rare, ma generano FP
 - Mutazione silente in *rpoB*: codone 514
 - Mutazione non silente, ma causa di modifiche lievi della MIC
- **Necessario lo sviluppo di altri target**
- **Il test fenotipico di sensibilità è ancora indispensabile!!**

Geni associati con farmaco-resistenza



NO 100% sensibilità

- **Principali geni identificati, ma conoscenze incomplete**

NO 100% specificità

- **Mutazioni non associate a resistenza**
- **Mutazioni associate a un fenotipo non prevedibile**

Uso della diagnosi molecolare in aree con bassa prevalenza di resistenza (1)

- **Test molecolare rapido per resistenza indicato se:**
 - **Sospetto di resistenza**
 - Storia di trattamento antiTB, soprattutto se recente, e recidiva
 - Trattamento in corso da almeno 2 mesi senza negativizzazione della coltura
 - Contatti di pazienti MDR (certi o sospetti)
 - Migranti da Paesi ad alta endemia di TB MDR
 - HIV positivi (maggiore frequenza di monoresistenza alla rifampicina)

Uso della diagnosi molecolare in aree con bassa prevalenza di resistenza (2)

- **Test molecolare rapido per resistenza indicato se:**
 - **I pazienti hanno un'ampia rete di contatti con implicazioni epidemiologiche verosimilmente estese**
 - Detenuti
 - Ospiti di case di riposo/lungodegenza/...
 - Operatori sanitari
 - Studenti
 - **I pazienti sono individui vulnerabili, con condizioni debilitanti o immunocompromessi**
 - **I pazienti sono conviventi di individui vulnerabili, neonati o soggetti immunocompromessi**

Uso della diagnosi molecolare in aree con bassa prevalenza di resistenza (3)

- Test molecolare rapido per resistenza indicato se:
 - **Aspetti relativi al laboratorio**
 - Le colture sono contaminate da altri batteri e l'antibiogramma non si può eseguire
 - Il campione è microscopico +, ma colturale -





Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review)

Steingart KR, Sohn H, Schiller I, Kloda LA, Boehme CC, Pai M, Dendukuri N



This is a reprint of a Cochrane review, prepared and maintained by The Cochrane Collaboration and published in *The Cochrane Library* 2013, Issue 1

<http://www.thecochranelibrary.com>

WILEY

Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review)

MTBC	sensibilità	specificità
In sostituzione es. microscopico	88%	98%
Add-on test microscopico neg	67%	98%
Microscopico pos/ coltura pos	98%	
Microscopico neg/ coltura pos	68%	
HIV	80%	
No HIV	89%	
Resistenza a rifampicina	94%	98%

Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review)

Conclusione

- **Sensibile e specifico come strumento diagnostico iniziale sia per MTBC che per resistenza a rifampicina**
- **Utile come strumento diagnostico addizionale in pazienti con esame microscopico negativo**
- **Risultato positivo per rif-resistenza = interpretare con attenzione e considerare sia il rischio di MDR-TB nel singolo paziente che la prevalenza attesa di MDR-TB in un dato setting**

Revisione letteratura recente

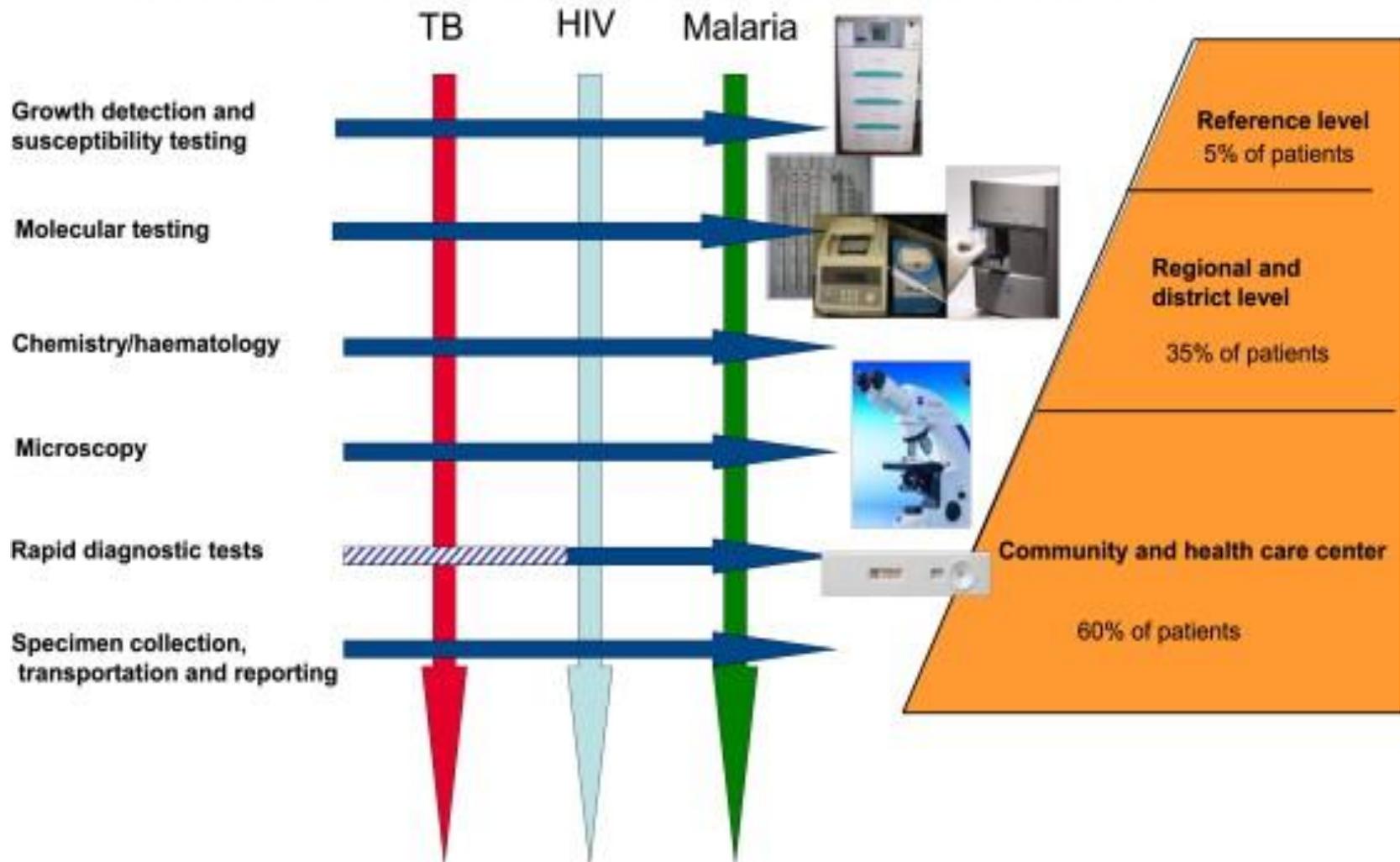
- **Se si usasse il GenExpert per la diagnosi di TB in ogni nuovo caso sospetto:**
 - Si ridurrebbe enormemente la frequenza e l'impatto del trattamento empirico, delle indagini sui contatti e dell'isolamento non necessari (>90%)
 - Si anticiperebbe l'istituzione di un trattamento efficace e si ridurrebbe l'esposizione degli operatori sanitari
 - Si potrebbero gestire in modo molto più razionale le strutture di isolamento

Am J Respir Crit Care Med 2014; 189: 1551–1559

ICHE 2014; 35: 1206-1027

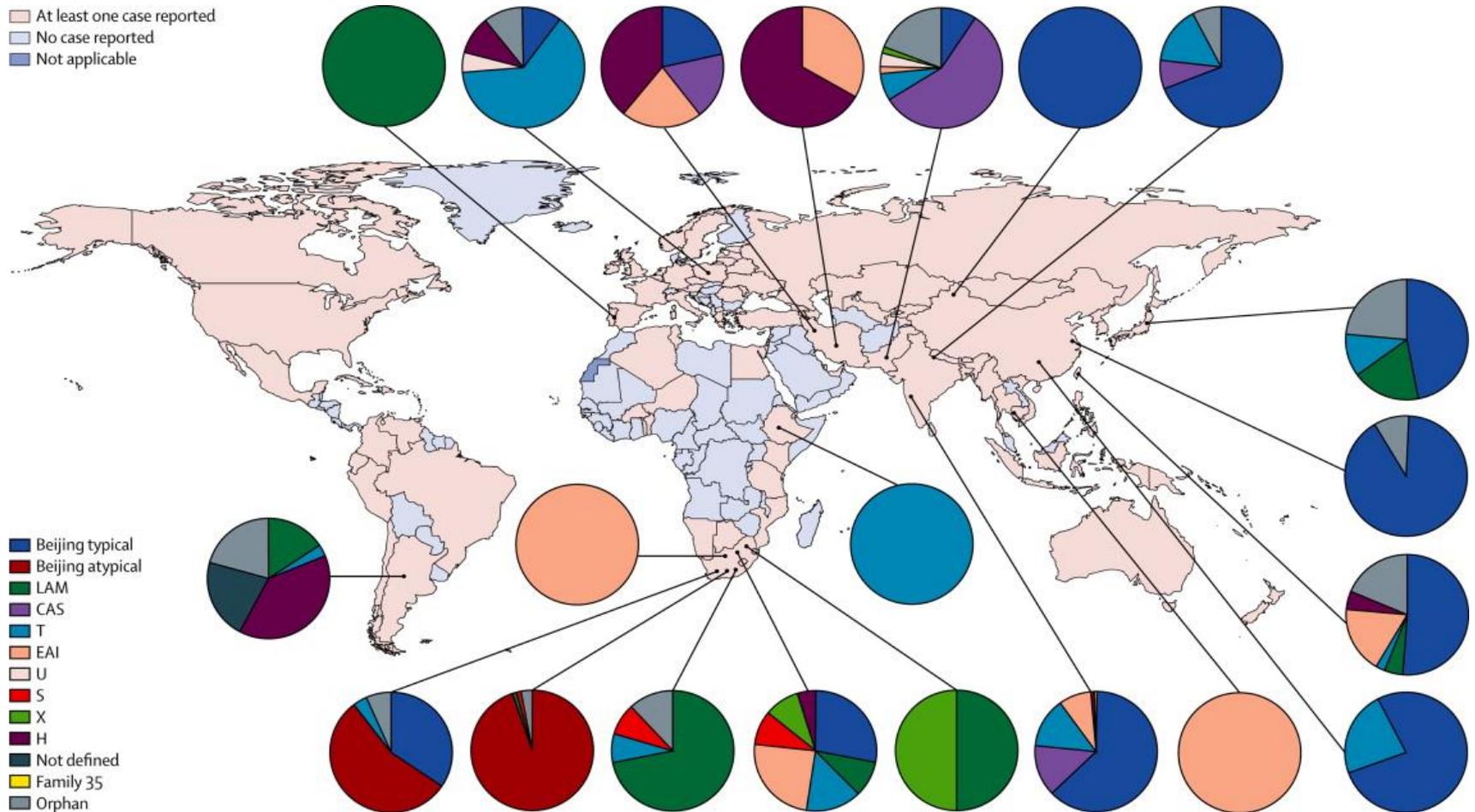
Clinical Infectious Diseases 204, sept 9

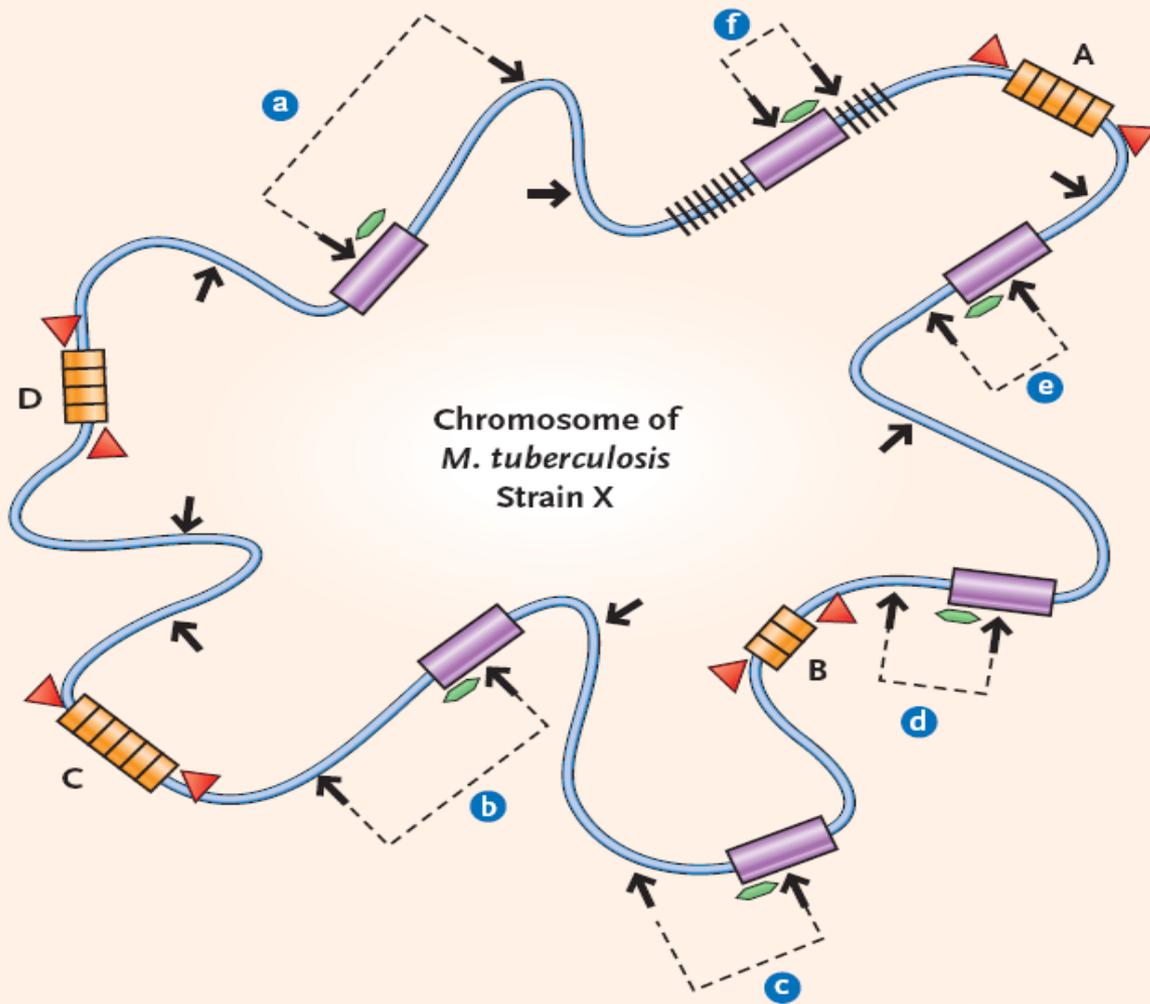
Integrated Laboratory Network: laboratory services and emerging infectious diseases



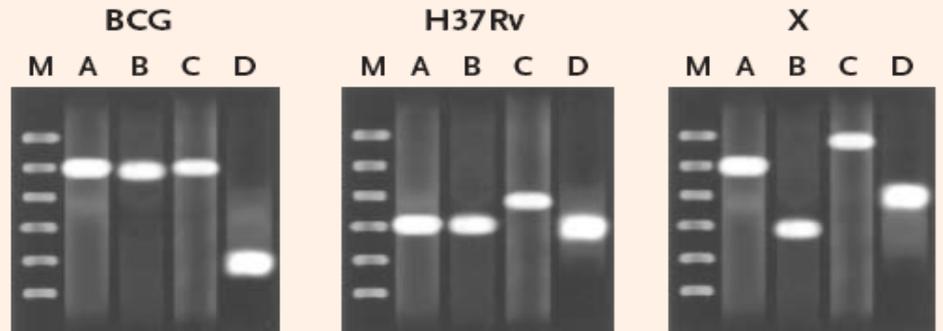
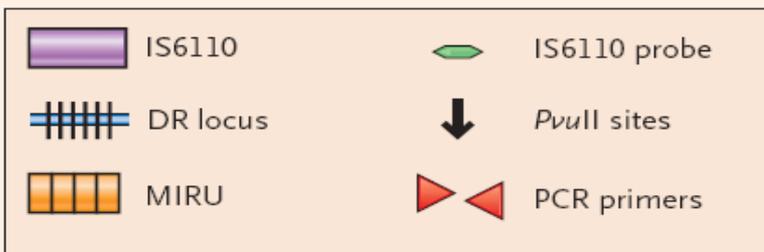
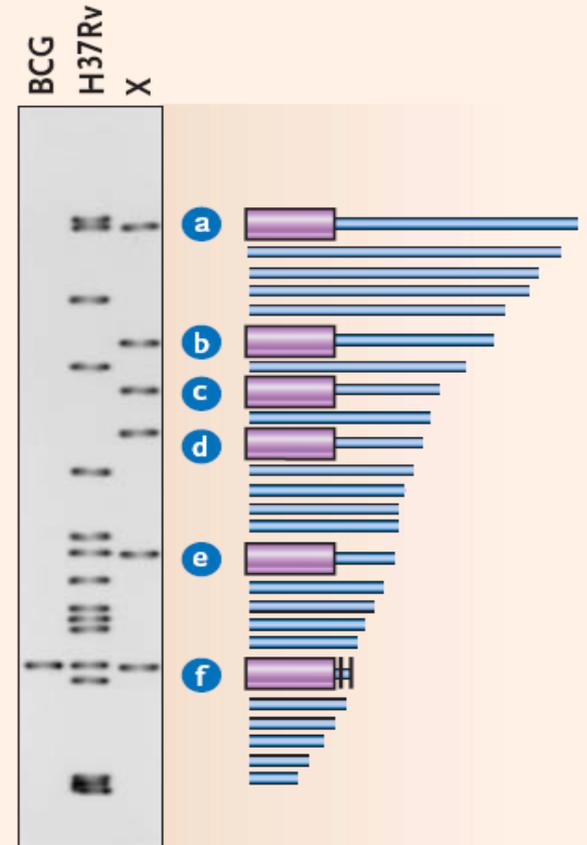
Epidemiologia molecolare della Tuberculosis

At least one case reported
 No case reported
 Not applicable





IS6110-Based Genotyping



MIRU-Based Genotyping

Epidemiologia molecolare della TB

Identificazione di stipti individuali o gruppi clonali di stipti dotati di un profilo genetico caratteristico (*fingerprinting*)

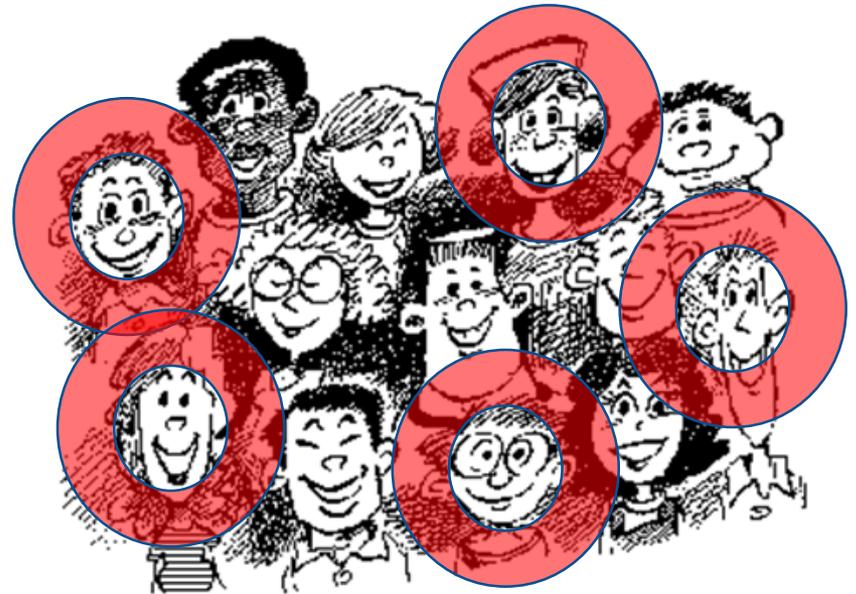
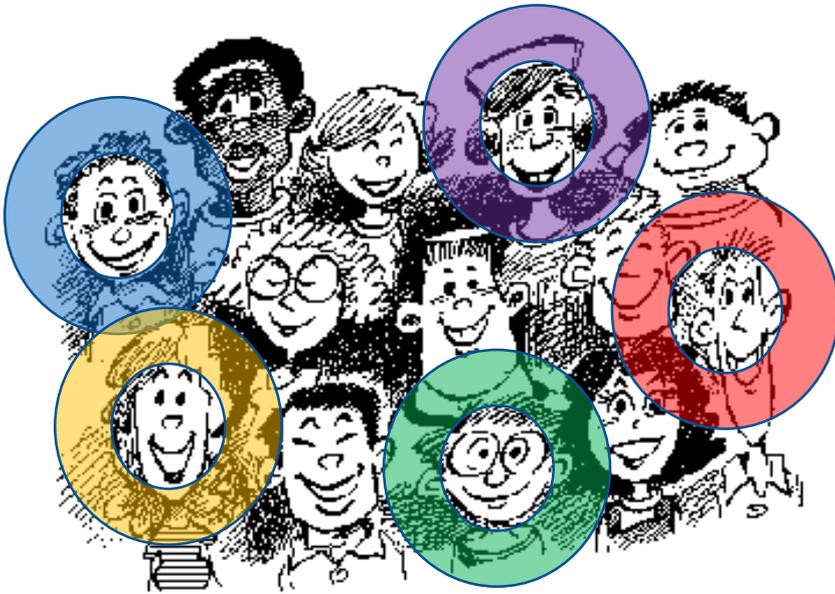
Il profilo genetico può essere associato a specifiche caratteristiche fenotipiche, quali:

- **Trasmissibilità**
- **Virulenza**
- **Resistenza ad agenti antibatterici**

Tubercolosi

- **Riattivazione**

- **Infezione recente**



Laboratorio di riferimento regionale

people aren't the only things
that can be interviewed



2011



pathogens can be interviewed too!

Collezione ceppi MTB 2012-2013

Conferma di laboratorio TB polmonare = 46,4%*

154 ceppi isolati a Palermo con ABG disponibile

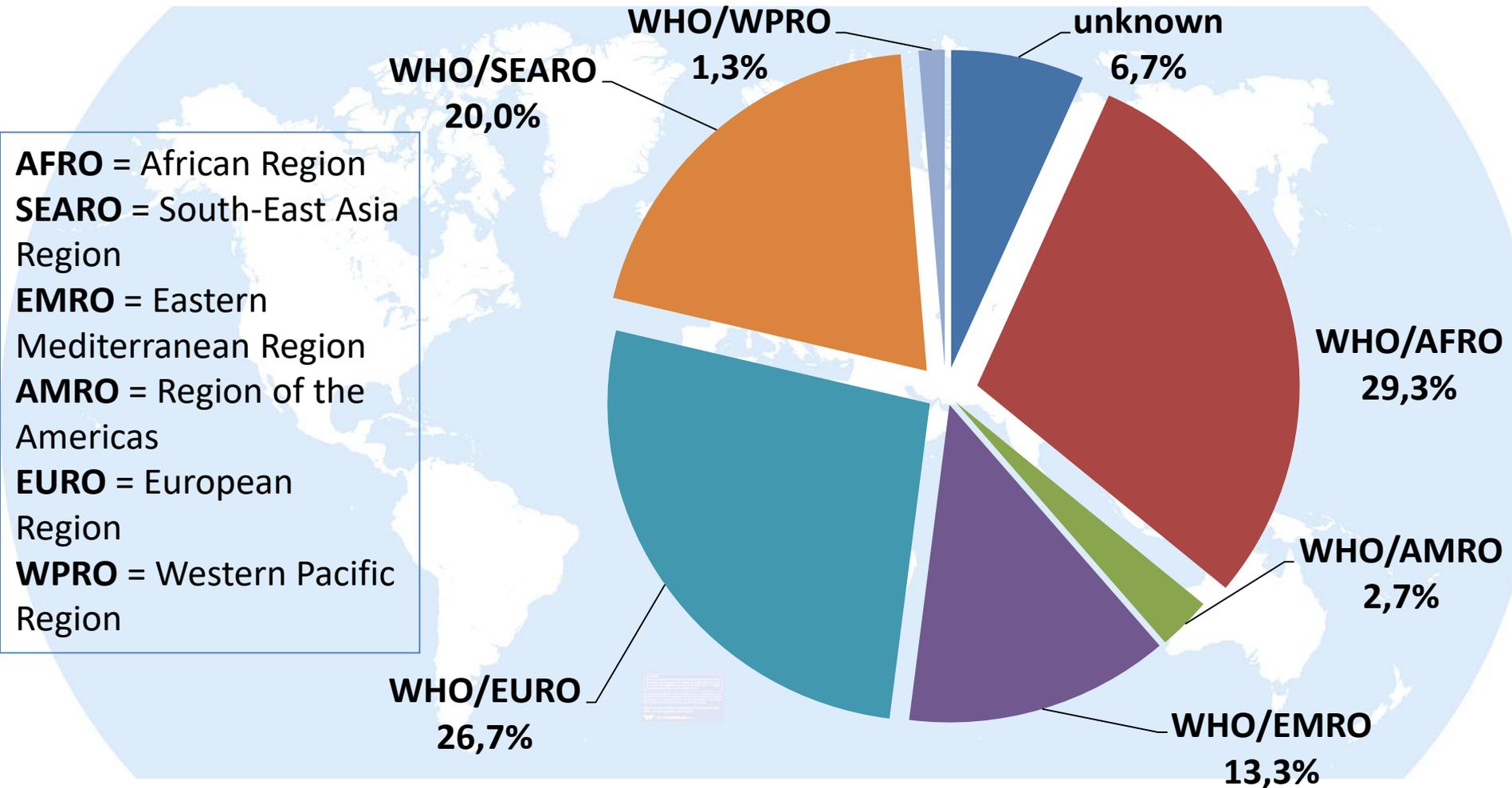
STREP	INH	RIF	ETB
10	20	3	5
6,5%	13,0%	1,9%	3,2%

MDR

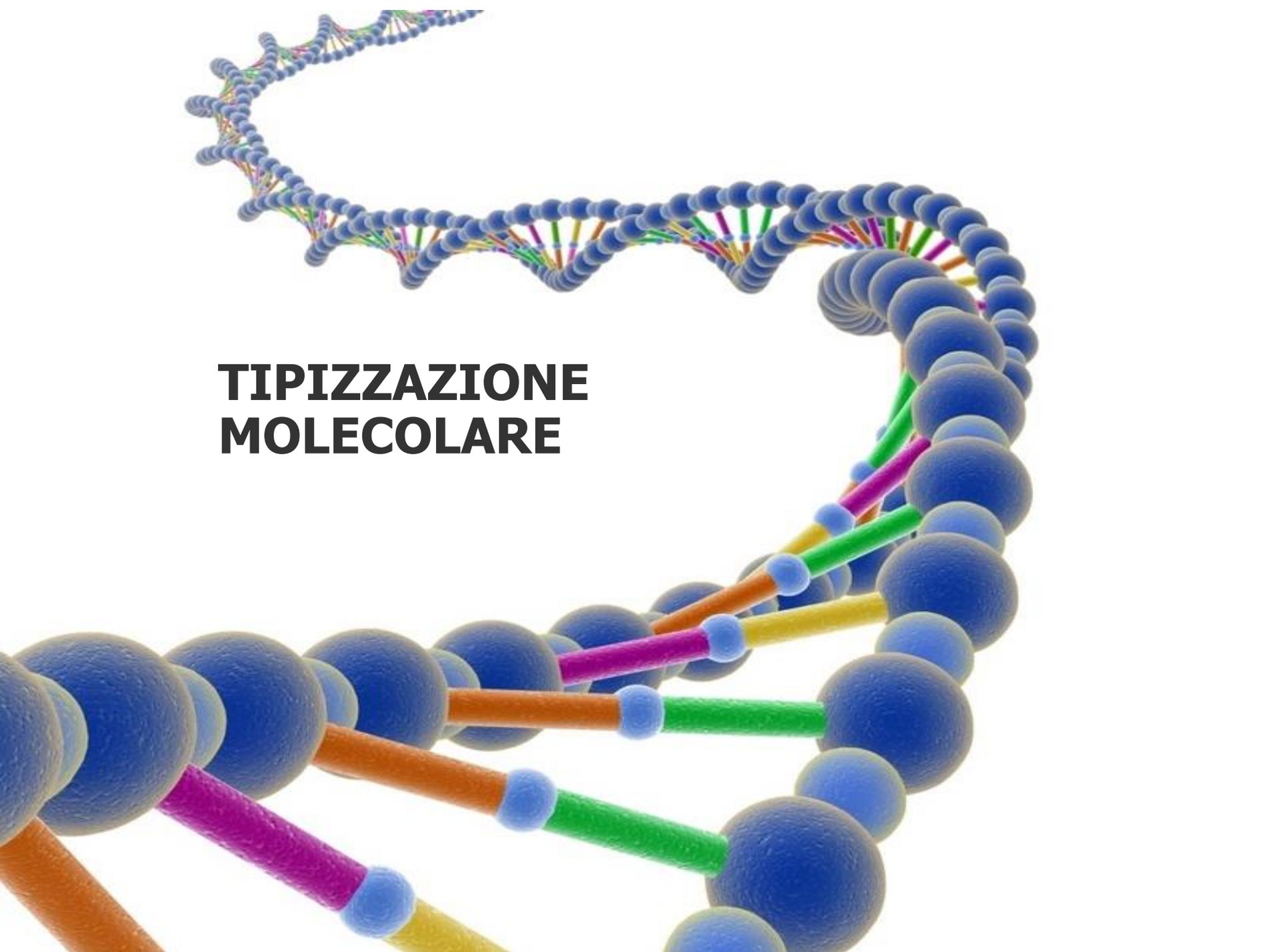
1 ita
Lineage U
1 non ita da Eritrea
Lineage Beijing

*2010 – 2013 Elaborazione dati SIMI

Collezione ceppi MTB 2012-2013

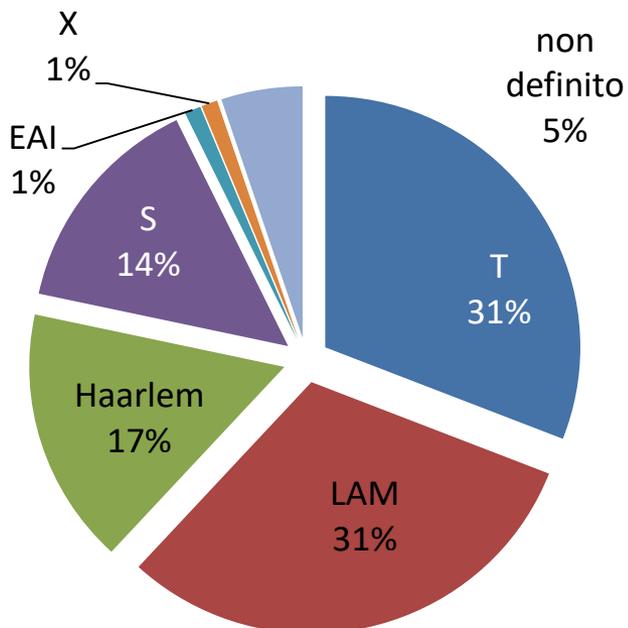


Nr. ceppi 152

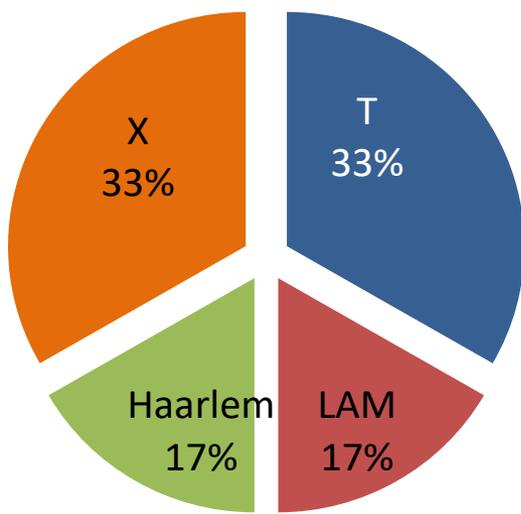


**TIPIZZAZIONE
MOLECOLARE**

Collezione ceppi MTB Palermo

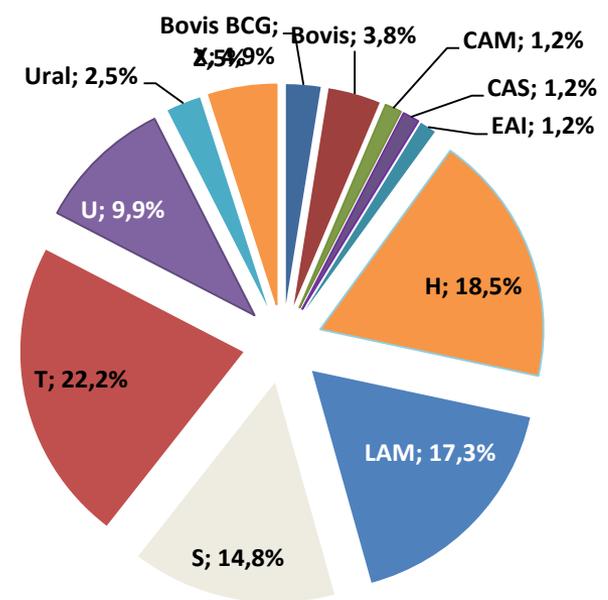


italiani

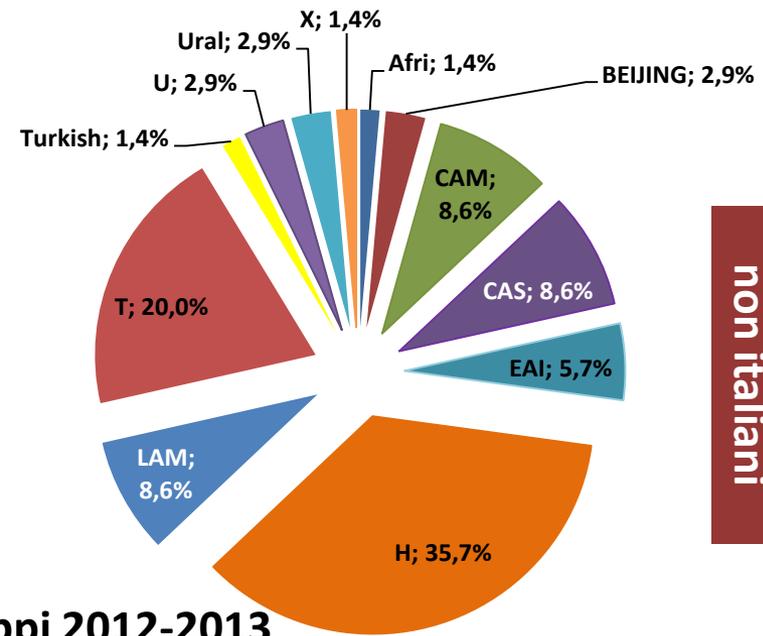


non italiani

103 ceppi 1994-2000



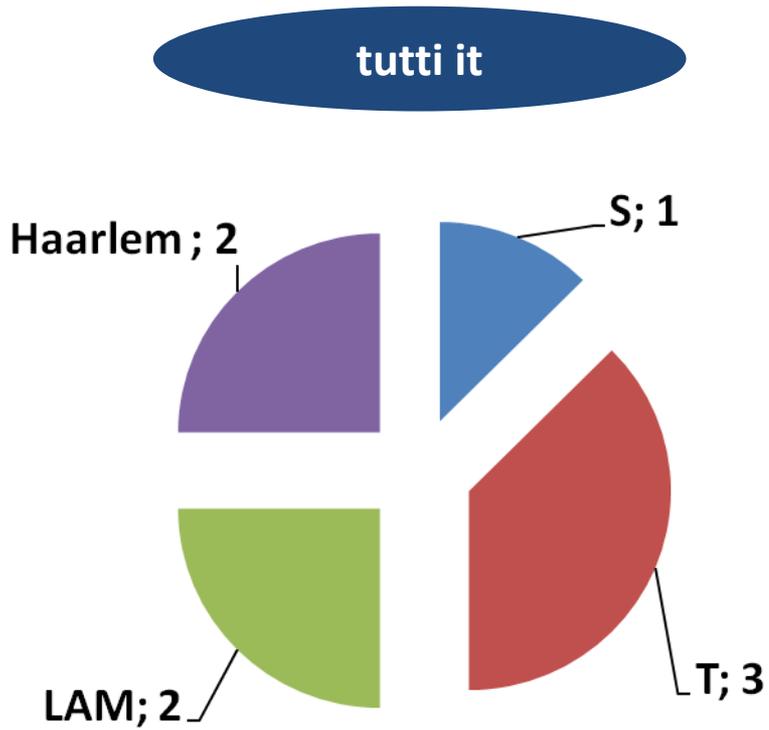
italiani



non italiani

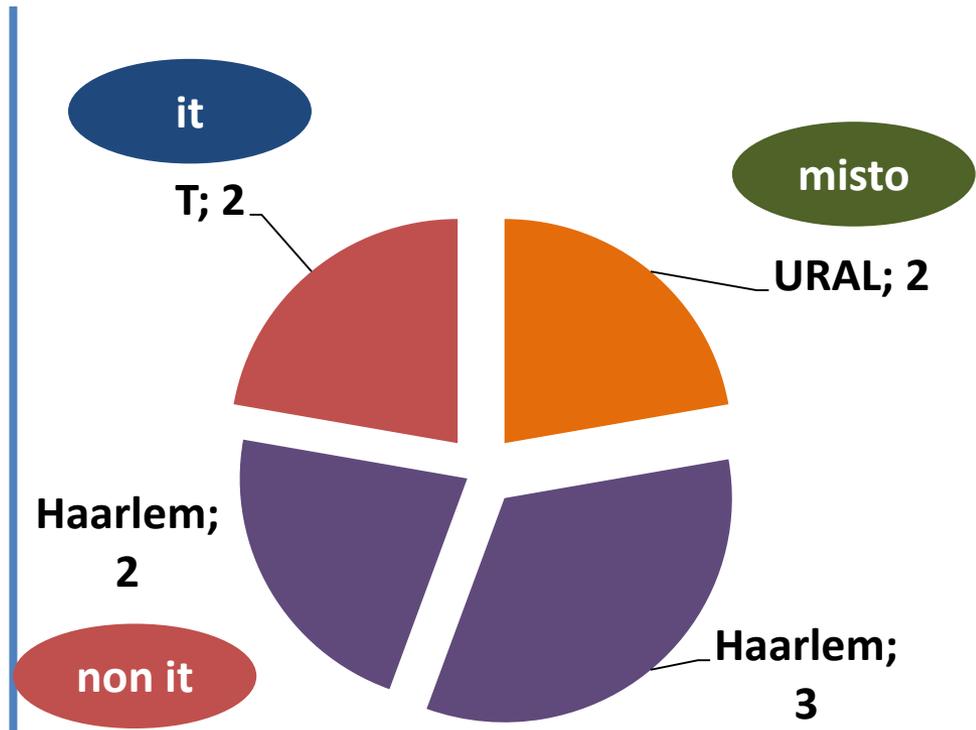
151 ceppi 2012-2013

Clustering ceppi MTB Palermo



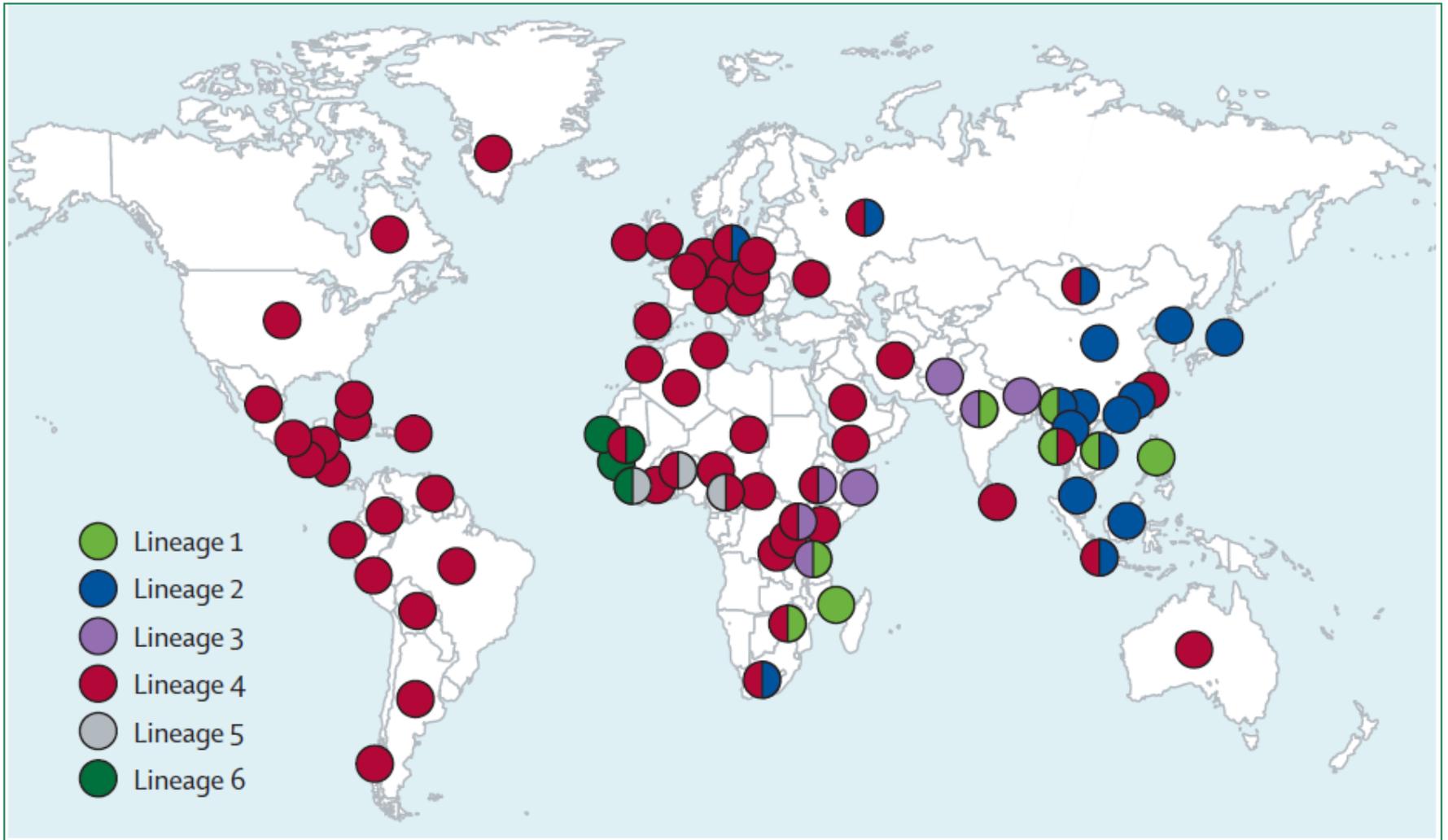
Proporzione di ceppi in cluster
13,4%

103 ceppi 1994-2000



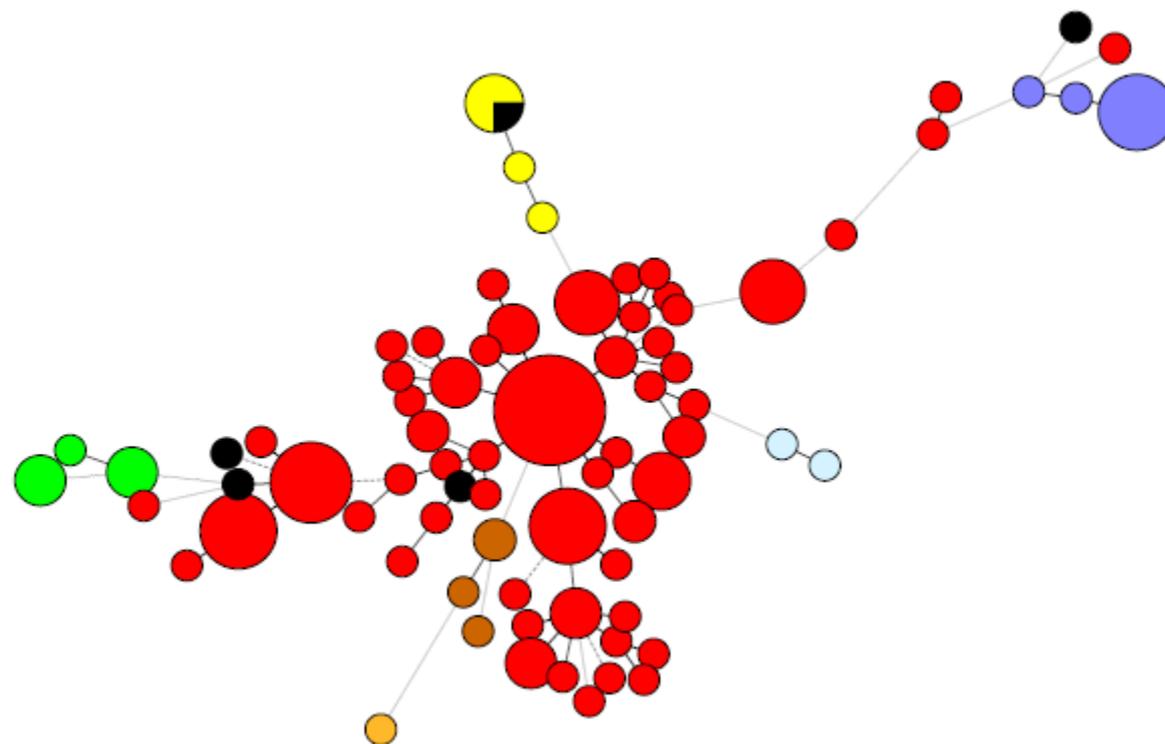
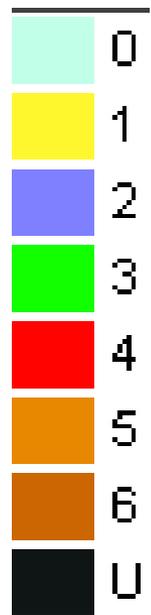
Proporzione di ceppi in cluster
6,2%

152 ceppi 2012-2013



Global phylogeography of *M. tuberculosis*

2014 by lineage



Considerazioni

- **Grande eterogeneità (identificati 5 di 6 lineage di MTBC)**
 - **Mix di riattivazione in popolazioni anziana autoctona e migrante residente da più tempo e infezioni recenti in popolazione di recente migrazione**
- ***Attenzione!***
 - **proporzione elevata di TB in età pediatrica ed in soggetti autoctoni relativamente giovani**
 - **importazione recente di ceppi virulenti/MDR**
 - ***M. bovis* e *M. bovis* BCG**
- **Limitate evidenze riguardanti la trasmissione tra migranti e popolazione autoctona**

Mamma li turchi???

**La tubercolosi
in Sicilia**



Sorveglianza





**Micobatteri non
tubercolari**

Micobatteri non tubercolari (NTM)

Gli NTM sono microrganismi ad habitat tipicamente ambientale

Generalmente a bassa patogenicità

Possono tuttavia causare un'ampio range di patologie:

- **Localizzazione polmonare – la più frequente**
- **Linfadenite nei bambini**
- **Malattie cutanee (*M. marinum* – acquari)**
- **Localizzazioni extrapolmonari e infezioni disseminate in pazienti gravemente immunocompromessi (*M. avium-intracellulare* complex)**

>140 specie

25 specie strettamente associate a malattia

Micobatteri non tubercolari (NTM)

L'identificazione corretta di specie è molto importante perché gli NTM differiscono per rilevanza clinica (da contaminanti – *M. gordonae* - a patogeni franchi – *M. kansasii* o *M. malmoense*)

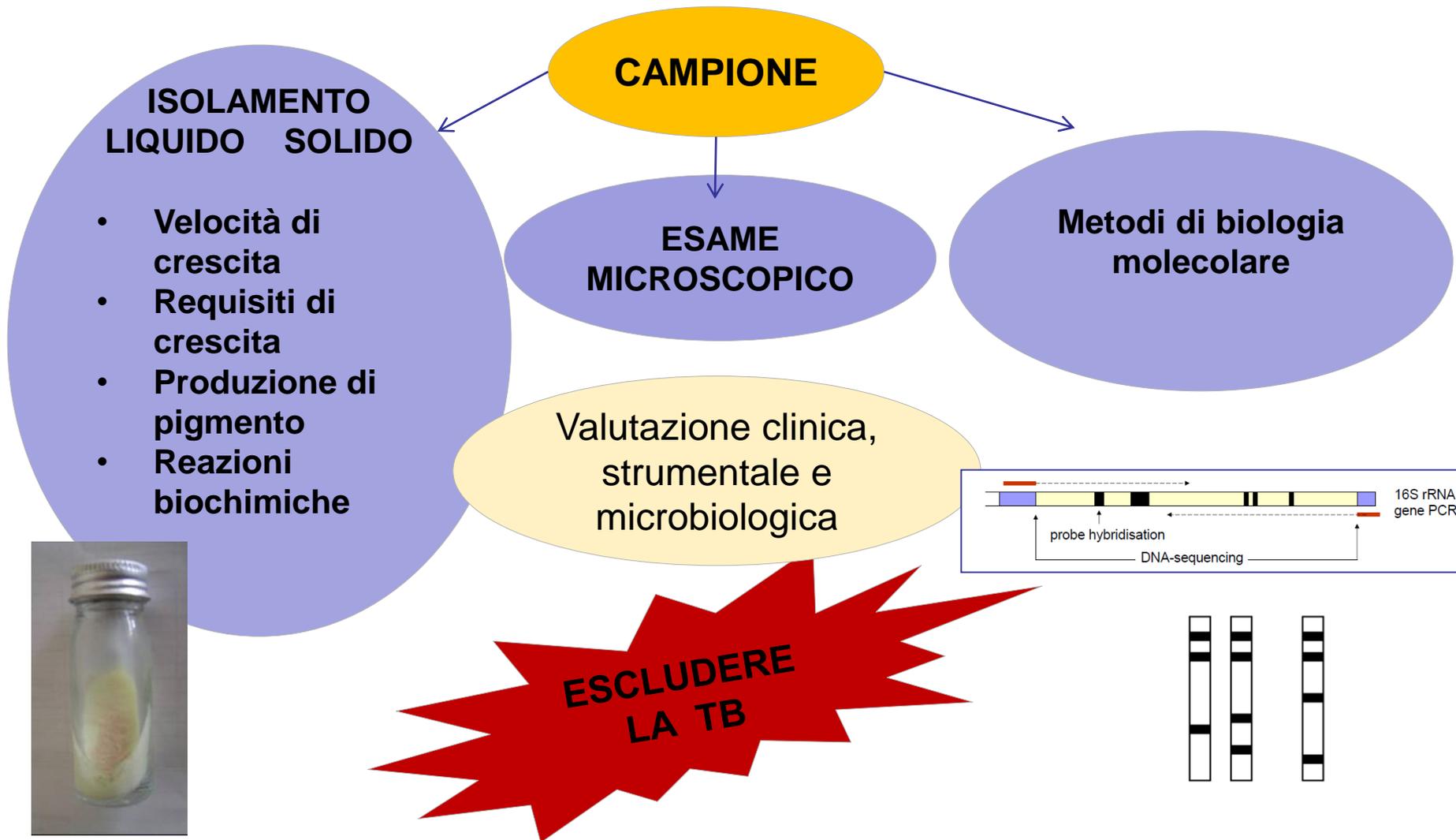
Ma differiscono anche per velocità di crescita, tolleranza alla temperatura e sensibilità ai farmaci

La diagnosi è complessa e richiede una buona comunicazione tra clinici, radiologi e microbiologi.



Micobatteri non tubercolari (NTM)

ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E SPECIAZIONE



Micobatteri non tubercolari (NTM)

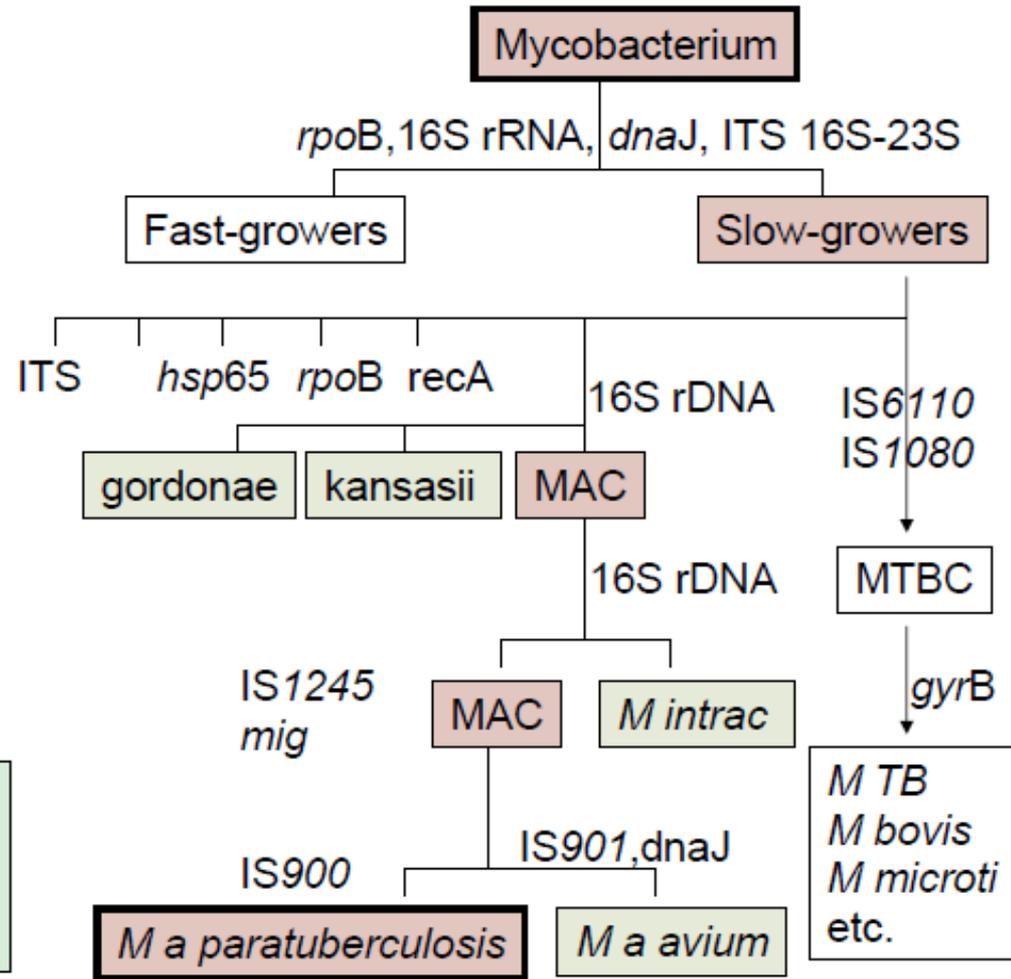
SEQUENZIAMENTO

Genes

16s rRNA (Ribosomal)
 ITS 16s-23S rDNA
 (Internal transcribed spacer)
dnaJ (Cold-shock protein)
Hsp 65 (Heat-shock protein)
rpoB (RNA polymerase)
recA
 IS 1245 (Insertion sequence)
 IS 901
 IS 900

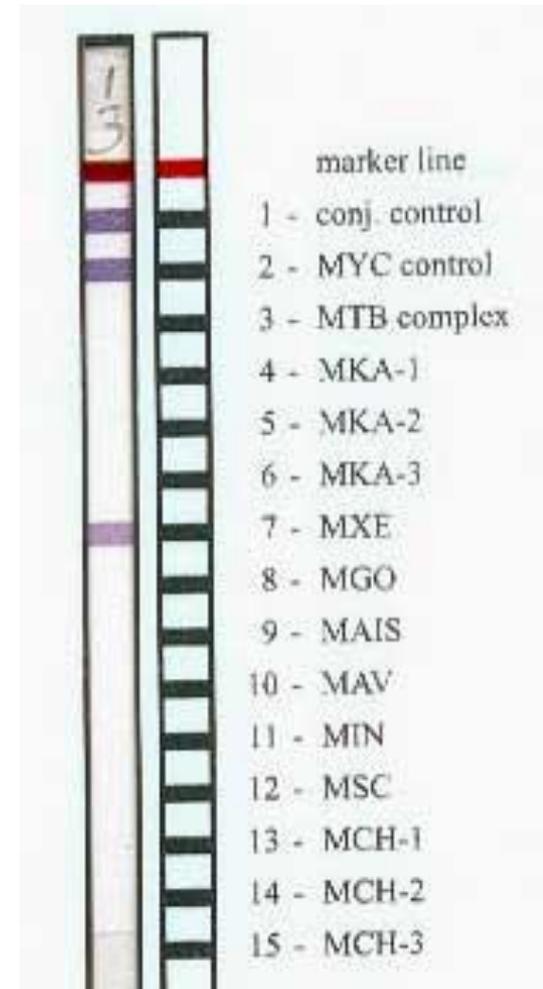
Common methods

PCR
 PCR-probe hybridisation
 PCR-RFLP
 PCR-DNA sequence analysis



Micobatteri non tubercolari (NTM)

INNOLIPA



Micobatteri non tubercolari (NTM)

Sensibilità agli antibiotici

Problemi di standardizzazione

Valore predittivo incerto rispetto all'efficacia clinica

Antibiotici da saggiare

***M. kansasii* – rifampicina**

MAC – claritromicina

A rapida crescita – aminoglicosidi, imipenem, chinoloni, claritromicina, cefoxitina, sulfonamidi

Metodi: eluizione da disco, microdiluizione in brodo, Etest, BACTEC MGIT

Grazie



am

stopping

TB

Domande?

