

Pneumologia Pediatrica

Barbara Maria Bergamini¹, Luca Richeldi²

A.O.U. Policlinico di Modena, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia: ¹Dipartimento Integrato Materno-Infantile; ²Dipartimento di Oncologia, Ematologia e Patologie dell'Apparato Respiratorio

L'infezione tubercolare nel bambino: il contributo dei nuovi test immunologici

Tuberculosis infection in children: role of the new T-cell based assays

Parole chiave: tubercolosi, bambino, Mantoux, Interferon- γ , test diagnostici

Keywords: tuberculosis, children, Mantoux, Interferon- γ , diagnostic tests

Riassunto. Negli ultimi decenni si è verificato un incremento dei casi di tubercolosi anche in aree tradizionalmente ritenute a bassa prevalenza di malattia, in particolare tra i giovani adulti recentemente immigrati. Questo fattore rappresenta un rischio di maggiore diffusione dell'infezione tra i bambini. I soggetti in età pediatrica, in particolare quelli al di sotto dei 5 anni di età, rappresentano un gruppo ad alto rischio di sviluppare malattia se infettati dal *M. tuberculosis*; peraltro, la diagnosi in questo gruppo di età presenta notevoli difficoltà per l'aspecificità del quadro clinico-radiologico e la bassa resa dei test microbiologici. I bambini ed i ragazzi a rischio di infezione tubercolare latente devono essere pertanto precocemente individuati ed opportunamente trattati.

Fino a pochi decenni or sono l'unico test disponibile per individuare i soggetti con infezione tubercolare latente era il test cutaneo tubercolinico (o test di Mantoux), che però presenta notevoli limiti, in particolare mostra scarsa sensibilità (nei pazienti immunodepressi) e scarsa specificità (nei soggetti vaccinati con BCG). Sono stati recentemente sviluppati test basati sul rilascio di interferone- γ che hanno dimostrato di avere buona sensibilità ed elevata specificità anche nei gruppi più a rischio. È prevedibile quindi che l'applicazione di questi nuovi strumenti diagnostici in ambito pediatrico possa contribuire ad una più accurata individuazione dei soggetti con infezione tubercolare contribuendo quindi a ridurre la diffusione della malattia nella popolazione generale.

Accettato per la pubblicazione il 20 novembre 2008.

Corrispondenza: Dott.ssa Barbara Maria Bergamini, Clinica Pediatrica, Dipartimento Integrato Materno-Infantile, A.O.U. Policlinico di Modena- Via del Pozzo 71, 41100 Modena; e-mail: barbamaria.bergamini@unimore.it

Introduzione

La tubercolosi ha rappresentato una delle patologie di maggiore impatto sociale nei secoli recenti e, nonostante il progressivo declino osservato nei paesi sviluppati a partire dalla metà dell'800, ancora oggi costituisce la prima causa di morte per singolo agente infettivo.

Si calcola che circa un terzo della popolazione mondiale sia infetto da *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e, secondo le cifre fornite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel 2005 i casi di tubercolosi (TB) erano 8,8 milioni, dei quali 1,3 milioni in soggetti sotto i 15 anni (1). La stragrande maggioranza

dei casi si verifica nei paesi in via di sviluppo, in particolare nell'Africa sub-sahariana dove la co-infezione con il virus dell'HIV ha determinato un drammatico aumento della incidenza e della mortalità (2). Particolarmente problematiche sono anche alcune regioni asiatiche quali India e Cina ed i paesi sovietici nei quali il crollo dei sistemi sanitari interni ha favorito il diffondersi di ceppi farmaco-resistenti in seguito all'inadeguato trattamento dei casi di malattia (3). Nei paesi a bassa prevalenza tubercolare, compresa l'Italia, il progressivo declino secolare della patologia tubercolare ha subito un arresto

a partire dagli anni '80 con un successivo lieve incremento del numero di casi segnalati. Questa inversione di tendenza è stata favorita da svariati fattori: l'invecchiamento della popolazione, l'aumento dei casi di immunodeficienza terapeutica o per HIV e l'aumento dell'immigrazione da paesi ad alta prevalenza di TB (4). Un ulteriore elemento critico è rappresentato dalla progressiva riduzione dell'interesse nei confronti della patologia tubercolare, considerata a torto "in via di estinzione", e dal conseguente smantellamento delle strutture preposte alla sorveglianza ed al contenimento della patologia.

I flussi migratori da paesi ad alta endemia tubercolare costituiscono probabilmente il fattore di maggior impatto per quanto riguarda il diffondersi dell'infezione tra i bambini. Alla fine degli anni '80 la maggior parte dei casi di malattia si verificavano in soggetti italiani nella fascia di età oltre i 65 anni. Questi pazienti avevano contratto l'infezione in gioventù, in un periodo in cui anche in Italia l'infezione da MTB era diffusa, e avevano sviluppato malattia in tarda età per patologie intercorrenti; questi casi davano origine a piccole epidemie familiari con coinvolgimento solo marginale di bambini. Attualmente la maggior parte dei casi contagiosi si verificano, invece, in soggetti di recente immigrazione nella fascia di età tra i 15 e i 44 anni, cioè in un periodo della vita caratterizzato da una maggiore possibilità di rapporto con bambini in ambito familiare e sociale (5). La sorgente del contagio nei bambini è rappresentata infatti da adulti o adolescenti con TB bacillifera nell'ambito familiare o sociale. Se il bambino infetto o ammalato ha meno di 3 anni è altamente probabile che il caso indice sia uno dei genitori o un altro parente convivente. Nelle età successive aumentano le probabilità che la sorgente dell'infezione sia all'esterno della famiglia.

La trasmissione avviene per via aerogena attraverso minutissime particelle (*droplet nuclei*) emesse dall'individuo affetto da TB bacillifera attraverso la tosse o la vocalizzazione. Tali particelle hanno un diametro aerodinamico di massa che ne consente sia la permanenza in sospensione per qualche ora, sia la penetrazione fino ai tratti distali delle vie aeree (1-5 μ). La probabilità di contrarre infezione in seguito all'esposizione ad un paziente contagioso dipende sostanzialmente dalla quantità di bacilli sospesi nell'aria ambiente (quindi dalla concentrazione di bacilli nell'espettorato del paziente, dall'intensità della tosse e dal tipo di ambiente in cui

avviene il contatto) e dalla durata del contatto stesso. Forme extra-toraciche di TB non rappresentano un rischio di trasmissione se non in occasione di particolari indagini strumentali in grado di liberare micobatteri e sospenderli nell'aria ambiente. La trasmissione per ingestione di latte infetto (*M. bovis*) e quella cutaneo-mucosa rappresentano attualmente una quota insignificante di casi di infezione anche nei paesi poveri. Temibile, ma rarissima è la TB prenatale (da infezione placentare) o perinatale (trasmissione al momento o subito dopo il parto).

Un bambino ammalato di TB ha necessariamente contratto l'infezione da poco tempo (solitamente i sintomi si manifestano entro 1 anno dal contagio). Per questa ragione un caso di TB in un bambino viene considerato un "evento sentinella", che segnala la presenza di una TB contagiosa nell'*entourage* del piccolo paziente, caso che andrà attivamente e prontamente ricercato. Più in generale, la numerosità dei casi di TB in soggetti di età pediatrica viene considerata come un indicatore dell'efficacia delle strategie di controllo della malattia tubercolare in una determinata popolazione.

Una volta avvenuto il contagio, molti sono i fattori che influiscono sulla probabilità che il bambino sviluppi o meno malattia: stato immunologico, condizioni di nutrizione, vaccinazione con BCG (Bacillo di Calmette-Guérin) e, soprattutto, l'età. Il rischio in assoluto più elevato si riscontra nei lattanti e nei bambini sotto l'anno di vita che si ammalano nel 50%-75% dei casi e che inoltre presentano un'alta incidenza di forme disseminate e di meningite. Il rischio rimane elevato fino ai due anni di vita, ma già dopo l'anno si riduce l'impatto delle forme disseminate. Negli anni successivi, il rischio di malattia decresce e nei bambini in età scolare è paragonabile, o addirittura inferiore, a quello degli adulti: 5% nei primi due anni dall'infezione, 7%-10% nei restanti anni di vita (6-8). Per ragioni non ancora completamente chiarite nel periodo adolescenziale si osserva un nuovo innalzamento del rischio di malattia a seguito di una recente prima infezione; in questa fascia di età, inoltre, non sono infrequenti casi di TB secondaria per riattivazione di infezioni contratte anni prima, in particolare in ragazzi di recente immigrati (9). I bambini con stati di immunocompromissione o malnutriti sono soggetti ad un rischio paragonabile a quello dei lattanti (7, 10). La relativa immaturità della risposta immune che caratterizza i primissimi anni di vita rappresenta

pertanto un fattore che incide considerevolmente sulla capacità di contenimento dell'infezione da parte del soggetto esposto e rende ragione del maggior rischio di malattia e di disseminazione in lattanti e bambini piccoli. Nei primi anni di vita sono stati documentati svariati difetti dell'immunità innata e specifica (tra cui ridotto *killing*, difettosa presentazione dell'antigene, ridotta polarizzazione Th1) che comportano una minore efficienza nel combattere l'infezione da patogeni intracellulari quali il MTB (11). La progressiva maturazione della risposta immune rende l'ospite capace di contenere i micobatteri nei foci della risposta iniziale, ma non di radicarli; si realizza quindi la condizione di infezione tubercolare latente (ITBL) che persiste tutta la vita e che espone il soggetto al rischio di riattivazione.

L'inoculazione di vaccino BCG rappresenta un potente stimolo Th1 che in parte corregge la difettosa risposta T-cellulare e determina una maggior capacità di contenimento dell'infezione (11-13). Il BCG somministrato alla nascita offre una significativa, sebbene non completa, protezione nei confronti delle devastanti forme di TB disseminata tipiche del primo anno di vita. L'effetto positivo sul sistema immune sembra coinvolgere altri patogeni intracellulari, come è suggerito dalla osservazione di una minore mortalità complessiva nel primo anno di vita nei bambini BCG vaccinati. Questo effetto "non-specifico" del BCG si mantiene dopo correzione per diversi confondenti quali lo stato HIV, condizioni di vita ed altre vaccinazioni a cui i bambini erano stati sottoposti (14).

La TB intratoracica

L'età del paziente influisce sia sulla probabilità di progressione che sulle manifestazioni cliniche della malattia tubercolare. Le forme di TB primaria proprie del bambino comportano manifestazioni cliniche e radiologiche sostanzialmente differenti rispetto a quelle "classiche" da riattivazione tipiche dell'adulto e dell'adolescente.

All'insediamento dei micobatteri consegue la formazione del classico complesso primario di Ranke (alveolite, linfangite, linfoadenite mediastinica); nel parenchima e nei linfonodi si sviluppano la flogosi granulomatosa e la necrosi caseosa che, nei casi favorevoli, evolvono verso la guarigione con fibrosi e calcificazione, con persistenza dei micobatteri all'interno delle lesioni. Alla formazione

del complesso primario si associa frequentemente una diffusione linfo-ematogena per lo più occulta, che nei lattanti è appunto responsabile dei quadri di malattia disseminata (meningite e miliare) che si manifestano entro 1-2 mesi dall'infezione.

La reazione infiammatoria è più pronunciata a livello dei linfonodi che del parenchima, ed è questa la principale caratteristica che differenzia il bambino dall'adulto. La vivace flogosi ed il massivo aumento di volume dei linfonodi mediastinici sono responsabili di ostruzione parziale o completa delle vie aeree che conducono ad iperinflazione o atelettasia dei segmenti a valle. Lo sviluppo di necrosi a carico di un linfonodo a contatto con le vie aeree può determinare la formazione di granulomi aggettanti nel lume o erodere la parete con passaggio di materiale infetto nel bronco che causa una ampia gamma di quadri di interessamento polmonare. In forme avanzate di malattia vi può essere l'erosione di altre strutture mediastiniche quali il pericardio, il nervo frenico o l'esofago. Se il focus primario risiede nel lobo superiore, i linfonodi interessati saranno quelli paratracheali, mentre verranno coinvolti quelli ilari se il focus è a carico dei lobi inferiori o del lobo medio (15).

Solo nei bambini nel primo anno di vita e negli immunocompromessi la sede del focus parenchimale può divenire la sede principale del processo patologico per lo scarso contenimento della moltiplicazione dei micobatteri nel punto di deposizione. Il danno parenchimale progressivo porta a quadri di consolidazione che possono complicarsi con cavitazione ed erosione bronchiale, pleurica o pericardica (TB polmonare progressiva). I quadri radiologici che si osservano nei bambini con TB sono quanto mai vari e, nelle fasi precoci di malattia, non caratteristici. Nel sospetto di una patologia TB andrà sempre richiesta una radiografia in entrambe le proiezioni per meglio evidenziare l'impegno linfonodale, elemento suggestivo anche se non dirimente.

La sintomatologia classica caratterizzata da febbre, astenia, sudorazione notturna, dimagrimento, tosse ed emoftoe in età pediatrica è presente praticamente solo negli adolescenti. Nei bambini più piccoli le manifestazioni respiratorie sono attenuate e prevalgono lo scadimento delle condizioni generali e la tachipnea. Nel bambino più grandicello possono essere presenti tosse, *wheezing* localizzato o diffuso (compressione bronchiale), rantoli localizzati e febbre, talvolta anche elevata.

Tali sintomi sono purtroppo assolutamente aspecifici, propri delle comuni flogosi delle vie aeree così frequenti in questa età.

Nei paesi ad alte risorse come il nostro, è infrequente che la diagnosi avvenga a stadi di malattia particolarmente avanzati, grazie alla rigorosa ricerca dei contatti dei casi denunciati e al facile accesso alle strutture sanitarie. Viceversa, circa l'80% delle diagnosi avviene in bambini pressoché asintomatici indagati per contatto con caso contagioso o per recente immigrazione (15). In sintesi, nel bambino ci troviamo di fronte a quadri clinico-radiologici piuttosto aspecifici; generalmente il dato che maggiormente orienta verso una eziologia tubercolare è quello "epidemiologico" di un contatto con un caso noto di TB o di provenienza da paesi ad alta endemia.

La conferma microbiologica è l'altro aspetto dolente della diagnosi di TB nel bambino: ottenere un campione di espettorato da esaminare è molto difficile nel bambino e praticamente impossibile nel lattante. In tali condizioni si ricorre al sondaggio gastrico eseguito di primo mattino con raccolta delle secrezioni inghiottite durante la notte. I migliori risultati si ottengono con 3 gastroaspirati per 3 giorni successivi. Su questi campioni vengono effettuati l'esame diretto dell'espettorato (disponibile in 24-48 ore, semplice e poco costoso) e la coltura con antibiogramma (richiede 20-40 giorni, occorre un laboratorio attrezzato). Essendo la TB primaria tipicamente paucibacillare, la resa di questi test nei bambini è complessivamente deludente; nell'adolescente, viceversa, si ottiene un isolamento colturale in un altissima percentuale di casi.

L'esame diretto dell'espettorato o del lavaggio gastrico consiste nella ricerca al microscopio ottico di bacilli alcool acido resistenti dopo colorazione con il metodo di Ziehl-Neelsen o con microscopio a fluorescenza dopo colorazione con auramina-rodamina. Solo i campioni con alta concentrazione di micobatteri risultano positivi; si calcola che un test positivo corrisponda ad una carica micobatterica di almeno $5 \times 10^3/\text{ml}$. La probabilità di ottenere un esame diretto positivo nei bambini con TB clinicamente accertata è di appena il 10%-15%. Nell'adolescente, che presenta frequentemente forme cavitari, il test è invece positivo nel 90%-100% dei casi e tale dato rimarca l'alta contagiosità di questi casi.

L'esame colturale positivo rappresenta il *gold standard* della diagnosi di tubercolosi attiva e rende

possibile accertare la sensibilità ai farmaci nel caso specifico. Sebbene più sensibile e specifico dell'esame diretto, la probabilità di isolare il micobatterio nei bambini non supera il 30%-40% dei casi (15). Un rendimento migliore rispetto ai test microbiologici eseguiti su gastroaspirato è stato riportato con la tecnica dell'espettorato indotto con aerosol di soluzione salina al 5% (16). La procedura induce tosse profonda ed espettorazione, condizioni che aumentano il rischio di trasmissione al personale sanitario o ad altri pazienti e deve pertanto essere eseguita in locali appositi (pressione negativa) da personale esperto con protezioni adeguate.

Se la coltura da lavaggio broncoalveolare aumenti o meno la resa degli accertamenti microbiologici è ancora oggetto di discussione; l'invasività della tecnica ne fa riservare l'uso ai casi con complicanze endo-bronchiali o nei quali è molto importante isolare il micobatterio per valutare la sensibilità ai farmaci (mancata identificazione del caso indice, sospetto di farmaco-resistenza) (17, 18).

Occorre comunque tenere presente che a causa della lenta crescita del micobatterio, il risultato della coltura è atteso anche con le nuove tecnologie su terreno liquido non prima di 20 giorni. Occorrono complessivamente 40 giorni per la conferma della negatività. I test molecolari basati sull'amplificazione del DNA micobatterico (*Polymerase Chain Reaction* o PCR) hanno una sensibilità del 40%-60% in casistiche pediatriche, pertanto superiore a quella delle tecniche colturali. Sebbene siano stati segnalati limiti sia tecnici che di interpretazione, i test molecolari (disponibili in qualche giorno) rappresentano un supporto di rilievo ed offrono la possibilità di abbreviare notevolmente i tempi della conferma del sospetto diagnostico (19-21).

L'infezione da MTB è ovviamente condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo di malattia tubercolare. La documentazione di una Mantoux positiva in un contesto clinico suggestivo infatti può avvalorare il sospetto diagnostico, ma non consente di fare diagnosi. In questo ambito, comunque, il limite principale della Mantoux (test cutaneo tubercolinico, TCT) è l'alta incidenza di anergia che si riscontra in particolare nei pazienti con forme disseminate, nei bambini sotto i 3 anni e negli immunocompromessi. In letteratura viene riportato che il 10%-14% dei bambini immunocompetenti con TB confermata risulta TCT-negativo al momento della diagnosi (18, 22);

tale percentuale aumenta notevolmente nei bambini piccoli o non immunocompetenti (23, 24). Pertanto, a fronte di un sospetto diagnostico fondato, non è possibile escludere una eziologia tubercolare sulla sola base di una Mantoux negativa.

L'infezione tubercolare latente

Nei paesi a bassa prevalenza, i cardini delle strategie di controllo e prevenzione della diffusione della TB sono la diagnosi precoce delle malattie attive (per ridurre i casi di contagio), e la ricerca attiva dei casi di ITBL nei gruppi a rischio (per evitare nuovi casi in futuro) (4). Da tempo sono state sospese le strategie di ricerca dei casi di TB latente attraverso *screening* di popolazione, mentre viene indicata la valutazione delle categorie a rischio (25). I soggetti maggiormente a rischio di infezione sono rappresentati indubbiamente dai bambini venuti a contatto con casi attivi di TB, rispetto alla quale i servizi di igiene pubblica devono mettere in atto una pronta e rapida ricerca dei contatti di ogni caso di malattia attiva segnalato.

In questi bambini occorre escludere tempestivamente una malattia in atto e valutare una condizione di infezione. L'alta percentuale di evoluzione a malattia a breve distanza dal contagio e i tempi necessari per lo sviluppo della ipersensibilità ritardata impongono nei soggetti sotto i 15 anni di iniziare la profilassi con isoniazide anche in caso di accertamenti iniziali negativi per infezione (chemioprolassi preventiva). Un controllo a distanza di 8-12 settimane dalla sospensione del contatto indirizzerà la futura condotta terapeutica: in caso di "conversione" la profilassi sarà prolungata per 9 mesi complessivi (chemioprolassi), in caso di persistente negatività il farmaco verrà sospeso.

Altri gruppi di popolazione a rischio di esposizione al MTB sono i bambini e gli adolescenti provenienti da paesi ad alta endemia o che vi abbiano soggiornato per periodi prolungati e, più in generale, quelli che vivono o hanno vissuto in famiglie o comunità a rischio (25-27). Lo *screening* di questi soggetti viene tradizionalmente eseguito con il TCT che, fino a pochi anni fa, era l'unico strumento disponibile per accertare una condizione di infezione in un soggetto non ammalato. Questi gruppi di popolazione tuttavia, provengono da paesi in cui è prassi vaccinare con BCG e nei quali sono diffuse le infezioni sub-cliniche da micobatteri non tubercolari (MNTB). Entrambe queste condizioni sono in grado di indurre reattività aspecifiche al

TCT e creano difficoltà di interpretazione del test (28). Il TCT prevede l'inoculazione intradermica di 5 UI di *purified protein derivative* (PPD) sulla superficie volare dell'avambraccio. Il PPD è un cocktail di circa 200 antigeni a basso peso molecolare ottenuto da colture di micobatteri in terreno liquido. Vi sono contenuti antigeni comuni ad altri micobatteri, in particolare ai ceppi di *M. bovis* usati per l'allestimento del BCG ed ai MNTB (29). In ragione dell'alto tasso di falsi negativi (determinati da condizioni che compromettono la risposta immune in via transitoria o permanente) e falsi positivi (legati principalmente a vaccinazione BCG ed infezione da MNTB) il *cut-off* del TCT varia in relazione al grado di rischio di esposizione e di sviluppo di malattia (Tabella 1). Valori di reazione ≥ 5 mm vengono infatti considerati positivi (Tabella 2) in bambini con sospetta TB, immunocompromessi o a contatto con un caso bacillifero. *cut-off* di 10 e 15 mm vengono suggeriti man mano che il rischio di esposizione e di malattia decrescono (30).

I nuovi test diagnostici per l'infezione tubercolare

La limitata sensibilità e la ridotta specificità del TCT vengono annoverate tra le cause principali dello scarso risultato delle strategie di controllo della patologia nei paesi industrializzati. Sono stati recentemente sviluppati nuovi test in vitro per la diagnosi di infezione tubercolare (Tabella 3) basati sul rilascio di interferone- γ (*Interferon-Gamma Release Assays*, IGRA) che risultano più sensibili e più specifici del TCT e che permettono di superare altri inconvenienti del test cutaneo.

L'interferone- γ (IFN- γ) è la citochina chiave della risposta specifica T-cellulare nei confronti degli antigeni tubercolari; i nuovi test, con due diverse metodiche, misurano l'IFN- γ liberato in risposta ad una stimolazione con antigeni specifici del MTB.

Sono attualmente commercializzati due test: il T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Regno Unito) ed il QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Cellestis, Australia). Il test T-SPOT.TB (TS.TB) è stato sviluppato in Inghilterra alla fine degli anni '90 ed è stato approvato per l'utilizzo diagnostico in vitro in Europa ed è stato anche approvato per l'uso clinico dalla Food and Drug Administration americana. La metodica prevede innanzitutto l'isolamento ed il controllo di vitalità delle cellule mononucleate da sangue periferico. Un numero standardizzato di tali cellule (2.5×10^5) viene immesso in pozzetti sul

Tabella 1 Fattori associati a falsa negatività del test cutaneo tubercolinico.

Fattori correlati al paziente
<ul style="list-style-type: none"> • Infezioni virali recenti (morbillo, varicella, parotite, HIV) • Vaccinazioni recenti con virus vivi (morbillo, parotite, polio, varicella) • Infezioni batteriche (febbre tifoide, brucellosi, pertosse, leptospirosi) • Tubercolosi recente (12 w) o ad andamento travolgente (meningite, miliare) • Patologie metaboliche (insufficienza renale cronica) • Stati di ipoproteinemia quali la malnutrizione • Patologie degli organi linfoidei (linfoma, leucemia cronica, Hodgkin, sarcoidosi) • Farmaci (corticosteroidi e altri agenti immunosoppressivi) • Età (<2 anni e anziani) • Stress (interventi chirurgici, ustioni, malattie mentali, GVHD)
Fattori correlati al reagente (tubercolina)
<ul style="list-style-type: none"> • Impropria conservazione • Impropria diluizione • Denaturazione chimica • Contaminazione
Fattori correlati all'esecuzione del test
<ul style="list-style-type: none"> • Iniezione sottocutanea • Somministrazione di una quantità ridotta • Ritardo nella somministrazione rispetto alla diluizione

Tabella 2 Definizione di reazione positiva al test cutaneo tubercolinico nel bambino, lattante ed adolescente, indipendentemente da eventuale vaccinazione con BCG.

≥5 mm
<ul style="list-style-type: none"> • Bambini con sospetta malattia tubercolare. • Bambini in stretto contatto con persone con malattia tubercolare nota o sospetta. • Bambini che ricevono terapia immunosoppressiva (comprese dosi immunosoppressive di steroidi) o con condizioni di immunosoppressione (compresa HIV).
≥10 mm
<ul style="list-style-type: none"> • Bambini ad aumentato rischio di forma disseminata: <ul style="list-style-type: none"> - <4 anni - con malattie ematopoietiche o croniche, malnutrizione • Bambini a maggior rischio di esposizione a casi di TB: <ul style="list-style-type: none"> - nati in, o con genitori provenienti da, zone ad alta endemia tubercolare - esposti ad adulti ad aumentato rischio di infezione e malattia tubercolare che hanno soggiornato in regioni del mondo ad alta prevalenza di TB.
≥15 mm
<ul style="list-style-type: none"> • Bambini >4 anni senza fattori di rischio per malattia o esposizione

cui fondo sono stratificati anticorpi anti-IFN- γ . L'aggiunta di antigeni specifici determina, nel caso siano presenti linfociti presensibilizzati, il rilascio di IFN- γ che verrà legato dagli anticorpi sul fondo. Il

successivo sviluppo colorimetrico dà luogo a spot neri che corrispondono al punto in cui era presente un linfocito che ha rilasciato IFN- γ (metodica ELISpot). Due pozzetti vengono impiegati per i

Tabella 3 Caratteristiche del test cutaneo tubercolinico e dei nuovi test a confronto. *possibile cross-reattività con *M. marinum*, *M. kansasii* e *M. szulgai*.

	T-SPOT.TB	QuantiFERON-TB	TCT
Antigeni	ESAT-6 e CFP10	ESAT-6, CFP10 e TB7.7	PPD
Controllo interno positivo	Si	Si	No
Standardizzazione dei reagenti	Si	Si	No
Possibile effetto booster	No	No	Si
Visita di ritorno	No	No	Si
Tempo per risultato	16-20 ore	16-20 ore	48-72 ore
Interpretazione	Oggettiva	Oggettiva	Soggettiva
Letture	Spot Forming Units	Unità di IFN- γ	mm
Metodo	ELISpot	ELISA	Reazione cutanea
Substrato del test	Cellule mononucleate (in vitro)	Sangue intero (in vitro)	Cute (in vivo)
Sistema di lettura	Conta degli spot (con lente o lettore automatizzato)	Misura della densità ottica con lettore automatizzato	Palpazione dell'infiltrato
Cross-reattività con BCG	No	No	Si
Cross reattività con MNTB	No*	No*	Si

due antigeni del MTB ed altri due per i controlli positivo e negativo. La quantità di sangue richiesta per tale test varia da 4 mL nei bambini sotto i 6 anni (periodo di fisiologica inversione della formula) a 8 mL in quelli più grandi.

Il test QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT-IT) è stato messo a punto alla fine degli anni '80 ed è stato approvato per l'uso clinico sia in Europa che negli Stati Uniti. La metodica non prevede l'isolamento ed il conteggio delle cellule mononucleate, ma utilizza sangue intero che viene raccolto direttamente in 3 piccole provette (1 mL ciascuna) che contengono già gli antigeni specifici (3 antigeni insieme in una provetta) o i controlli negativo e positivo. Dopo opportuna incubazione e centrifugazione il plasma può essere separato e processato con metodica ELISA oppure refrigerato in attesa del successivo dosaggio dell'IFN- γ . Questo semplifica le procedure di laboratorio e rende il test più maneggevole anche quando non sia disponibile un laboratorio attrezzato che analizzi il campione immediatamente.

I test IGRA rappresentano una reale innovazione nell'ambito della diagnostica della patologia tubercolare da decenni. I campi di applicazione di questi test sono tutti quelli classici in cui è stata finora applicato il TCT: diagnosi di infezione tubercolare

sia attiva che latente, diagnostica della malattia tubercolare, tracing dei contatti e *screening* di popolazioni a rischio (31). Il principale punto di forza risiede nella tipologia di antigeni attualmente utilizzati: ESAT6 e CFP10 nel TS.TB ai quali si aggiunge la proteina TB 7.7 nel QFT-IT. Queste proteine infatti vengono espresse solo dal MTB, mentre non sono presenti nei ceppi di *M. bovis* utilizzati per l'allestimento del BCG e nella stragrande maggioranza dei MNTB. La risposta al test è pertanto specifica di infezione da MTB, eliminando così le principali possibili interferenze. L'alta specificità rende i nuovi test particolarmente utili nello *screening* dei pazienti a rischio di infezione latente per provenienza da paesi endemici o soggiorno in tali paesi. Si tratta infatti, come accennato, di popolazioni ad alta prevalenza di vaccinazione BCG ed infezione da MNTB nelle quali una risposta positiva (≥ 10 mm) è frequente anche in assenza di infezione (18). Nella nostra esperienza, un certo numero di bambini o ragazzi con TCT positivo è risultato negativo ai nuovi test, ed è stato pertanto possibile evitare un discreto numero di profilassi improprie, mentre altri pazienti con TCT inferiore a 10 mm sono in realtà risultati infetti.

La sensibilità dei test IGRA è stata studiata in soggetti con TB con coltura positiva dimostrando di

essere almeno altrettanto sensibili del TCT (80%-97%) e molto più specifici (90%-100%) (32-34). L'ambito più importante nel quale gli IGRA dimostrano la netta superiorità rispetto al TCT è quello relativo alla ricerca dell'infezione nei soggetti immunocompromessi e nei bambini piccoli. Proprio in questi pazienti, il TCT mostra il più alto tasso di anergia, mentre i nuovi test mantengono una elevata accuratezza (23, 35-38). Come accennato, entrambe le metodiche (ELISpot ed ELISA) prevedono l'utilizzo di un controllo negativo ed un controllo positivo. Quest'ultimo ha lo scopo di testare la capacità dei linfociti del paziente a rispondere agli stimoli ed è rappresentato da un mitogeno aspecifico (fitoemoagglutina o PHA). In caso di mancata risposta al controllo positivo il test viene considerato "indeterminato" (o "invalido"), pertanto non interpretabile. Ad un risultato indeterminato viene attribuito il significato di una potenziale depressione immunitaria o "anergia". Un controllo di questo tipo non è presente nel TCT e non è pertanto possibile discriminare tra mancata reattività cutanea per "vera negatività" o per anergia. L'incidenza degli indeterminati è risultata più elevata nei pazienti immunocompromessi e nei bambini piccoli testati con la metodica QuantiFERON (in particolare con la versione precedente QuantiFERON-TB Gold) rispetto al TS.TB che mantiene una buona performance anche in queste situazioni (39, 40). In una casistica

di 41 neonati valutati con TS.TB presso il Policlinico di Modena non sono stati riscontrati test indeterminati (41). È probabile che la differenza di *performance* tra le due metodiche sia da attribuire al fatto che il TS.TB, contrariamente alla metodica dei QuantiFERON, prevede la conta e la verifica della vitalità delle cellule mononucleate. Il notevole numero di studi pubblicati fino ad ora ha spinto diverse organizzazioni di salute pubblica ad includere i nuovi test nelle Linee Guida per la prevenzione e la cura della tubercolosi. I Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) americani suggeriscono la completa sostituzione del TCT con gli IGRA, strategia che mostrerebbe un buon rapporto costo/beneficio nelle popolazioni a rischio d'infezione ed alta incidenza di vaccinazione con BCG in ragione del prevedibile risparmio di interventi diagnostici e di trattamenti inutili (31). Le Linee Guida inglesi del Royal College of Physicians suggeriscono invece il mantenimento del TCT affiancato ai test IGRA per la conferma dei test cutanei positivi o per l'utilizzo in pazienti in cui è prevedibile un TCT con risultato non affidabile per rischio d'anergia (42). Attualmente non è ancora possibile affermare con sicurezza quale sia la strategia migliore in ambito pediatrico, ma è certo che i bambini, in ragione della loro vulnerabilità se infettati dal MTB, potranno ottenere grandi benefici dalla diffusione dell'utilizzo appropriato dei nuovi test nella pratica clinica.

Bibliografia

1. World Health Organization Global tuberculosis control surveillance, planning, financing. *WHO report 2007* (WHO/TB/2007 376). Geneva; 2007.
2. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, et al. *The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic*. Arch Intern Med 2003; 163: 1009-1021.
3. Zignol M, Hosseini MS, Wright A, et al. *Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis*. J Infect Dis 2006; 194: 479-485.
4. Broekmans JF, Migliori GB, Riederet HL, et al. *European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. Recommendations of the World Health Organization (WHO), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) and Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV) Working Group*. Eur Respir J 2002; 19: 765-775.
5. Ministero della salute, Repubblica Italiana. *Epidemiologia della tubercolosi in Italia (anni 1995-2005)*; 2007.

6. Rieder H. Annual risk of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 2005; 25: 181-185.
7. Starke JR. *Tuberculosis in children*. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25: 353-364.
8. Marais BJ. *Tuberculosis in children*. *Pediatr Pulmonol* 2008; 43: 322-329.
9. Marais BJ, Donald PR, Gie RP, et al. Diversity of disease in childhood pulmonary tuberculosis. *Ann Trop Pediatr* 2005; 25: 79-86.
10. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, et al. The natural history of disease of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of the pre-chemotherapy literature. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 392-402.
11. Lewinsohn DA, Gennaro ML, Scholvinck L, et al. Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 658-674.
12. Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination. *J Immunol* 1999; 163: 2249-2255.
13. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271: 698-702.
14. Garly ML, Martins CL, Balé C, et al. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine* 2003; 21: 2782-2790.
15. Starke JR. *Tuberculosis*. In: Behrman R, Kliegman R, Jenson H, eds. *Nelson. Trattato di Pediatria*, XV edizione. Torino, Italy: Minerva Medica; 1997: 819-831.
16. Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, et al. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet* 2005; 365: 130-134.
17. Singh M, Moosa NVA, Kumar L, et al. Role of gastric lavage and bronchoalveolar lavage in the bacteriological diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis. *Indian Pediatric* 2003; 37: 947-951.
18. Khan EA, Starke JR. Diagnosis of tuberculosis in children: increased need for better methods. *Emerging Infect Dis* 1995; 1: 115-123.
19. Smith KC, Starke JR, Eisenach K, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens from children using a polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1996; 97: 155-160.
20. Fauville-Dufaux M, Waelbroeck A, De Mol P et al. Contribution of the polymerase chain reaction to the diagnosis of tuberculous infections in children. *Eur J Pediatr* 1996; 155:106-111.
21. Delacourt C, Poveda JD, Chureau C, et al. Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1995; 126: 703-709.
22. Steiner P, Rao M, Victoria MS, et al. Persistently negative tuberculin reactions: their presence among children with culture positive for *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculin-negative tuberculosis). *Am J Dis Child* 1980; 134: 747-750.
23. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. *Lancet* 2004; 364: 2196-2203.
24. Starke JR, Taylor-Watts KT. Tuberculosis in the pediatric population of Houston, Texas. *Pediatrics* 1989; 84(1): 28-35.
25. Pediatric Tuberculosis Collaborative Group. Targeted Tuberculin Skin Testing and Treatment of Latent Tuberculosis Infection in Children and Adolescents. *Pediatrics* 2004; 114: 1175-1201.
26. Froehlich H, Ackerson LM, Morozumi PA. Targeted Testing of Children for Tuberculosis: validation of a risk assessment questionnaire. *Pediatrics* 2001; 107: E54.
27. Nelson LJ, Jereb JA, Castro KG. New guidelines about latent tuberculosis infection in children and adolescent: a welcome advancement. *Pediatrics* 2004; 114: 1084-1086.
28. Wang L, Turner MO, Elwood RK, et al. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002; 57: 804-809.
29. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 968-975.

- 30.** American Thoracic Society. *Diagnostics Standards and Classification of Tuberculosis in adults and children*. Am J Resp Crit Care Med 2000; 161: 1376-1395.
- 31.** Centers for Disease Control and Prevention. *Guidelines for using the QuantiFERON TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis Infection*. Morb Mortal Wkly Rep 2005; 54: 49-55.
- 32.** Pai M, Kalantri S, Dheda K. *New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis, part I*. Expert Rev Mol Diagn 2006; 6: 413-422.
- 33.** Lalvani A, Millington A. *T cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection*. Curr Opin Infect Dis 2007; 20: 264-271.
- 34.** Pai M, Zwerling A, Menzies D. *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update*. Ann Intern Med 2008; 149: 1-8.
- 35.** Lawn SD, Bangani N, Vogt M, et al. *Utility of interferon-gamma ELISPOT assay response in highly tuberculosis exposed patients with advanced HIV infection in South Africa*. BMC Infect Dis 2007; 7: 99.
- 36.** Piana F, Ruffo Codecasa L, et al. *Use of T-SPOT in latent tuberculosis infection diagnosis in general and immunosuppressed populations*. New Microbiol 2007; 30: 286-290.
- 37.** Richeldi L, Luppi M, Losi M, et al. *Diagnosis of occult tuberculosis in hematological malignancy by enumeration of antigen-specific T cells*. Leukemia 2006; 20: 379-381.
- 38.** Matulis G, Jüni P, Villiger PM, et al. *Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases: performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen-specific interferon gamma assay*. Ann Rheum Dis 2008; 67: 84-90.
- 39.** Ferrara G, Losi M, Meacci M, et al. *Routine hospital use of a commercial whole blood interferon-gamma assay for tuberculosis infection*. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172:631-635.
- 40.** L Richeldi, K Ewer, Losi M, et al. *T Cell-Based Tracking of Multidrug Resistant Tuberculosis Infection after Brief Exposure*. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170: 288-295.
- 41.** Ferrara G, Losi M, D'Amico R, et al. *Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study*. Lancet 2006; 367: 1328-1334.
- 42.** National Institute for Health and Clinical Excellence. *Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*. Available at: <http://www.nice.org.uk>.
- 43.** Richeldi L. *An update on the diagnosis of tuberculosis infection*. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174: 736-742.