

SOMMARIO

Introduzione.....	2
Eziologia	3
Epidemiologia.....	4
<i>M. tuberculosis lineages</i>	14
Trasmissione e patogenesi	17
Diagnosi di laboratorio.....	19
<i>Whole genome sequencing</i>	21
Diagnosi radiologica	22
Terapia della tubercolosi.....	23
Infezione tubercolare latente	26
Tubercolosi e migranti	27
<i>Contact tracing</i>	27
Obiettivi dello studio.....	32
Disegno dello studio.....	32
Dati raccolti	32
Analisi microbiologiche	33
Approvazione del Comitato Etico.....	34
Analisi statistica.....	34
Risultati.....	34
Risultati WGS.....	40
Integrazione tra dati epidemiologici e WGS	47
Discussione.....	53
Conclusioni	56
Bibliografia	56

Introduzione

La tubercolosi (TB) è una malattia trasmissibile e rappresenta un importante problema di Salute Globale. È infatti una delle principali cause di malattia e prime cause di morte a livello mondiale. È causata da *Mycobacterium tuberculosis* complex, che viene trasmesso da persone malate che attraverso la tosse espellono bacilli. La tubercolosi può localizzarsi in qualsiasi organo e/o apparato, la forma più diffusa è quella polmonare. Si stima che circa un quarto della popolazione mondiale sia infettata dal bacillo della tubercolosi. Si tratta di una malattia curabile e prevenibile, ma è necessario garantire a tutti l'accesso alle cure e ai servizi sanitari e ridurre il numero di persone infette e malate con azioni mirate ai determinanti di TB, quali la povertà, la malnutrizione, l'infezione da HIV, il fumo e il diabete. L'impatto della pandemia COVID (*COronaVirus Disease 19*) ha vanificato anni di progresso nel fornire servizi essenziali per la cura della TB e per la riduzione dell'impatto della malattia, con una riduzione del numero di nuove diagnosi: i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) mostrano una riduzione dei nuovi casi da 7.1 milioni nel 2019 a 5.8 milioni nel 2020 (fig.1). Il contributo maggiore (93%) a questa riduzione è dato da 16 Paesi (India, Indonesia e Filippine in particolare) e ciò è destinato a tradursi in un incremento del numero di morti per TB nei prossimi anni per mancato accesso ai servizi sanitari e mancate diagnosi (fig. 2). Questo mancato accesso alle cure si riflette anche su una riduzione di trattamenti per forme TB multiresistenti (-15%, da 177100 a 150359) e per infezioni tubercolari latenti (-21%, da 3.6 milioni a 2.8 milioni) [1].

Figura 1: Trend globale delle notifiche di nuove diagnosi di tubercolosi, 2016-2020 [1].

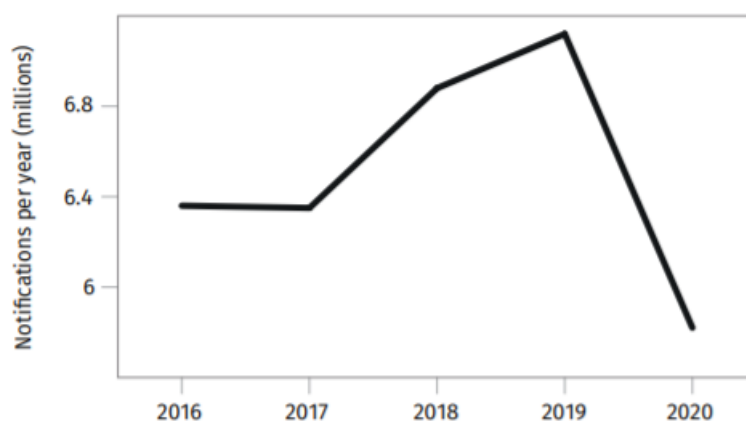
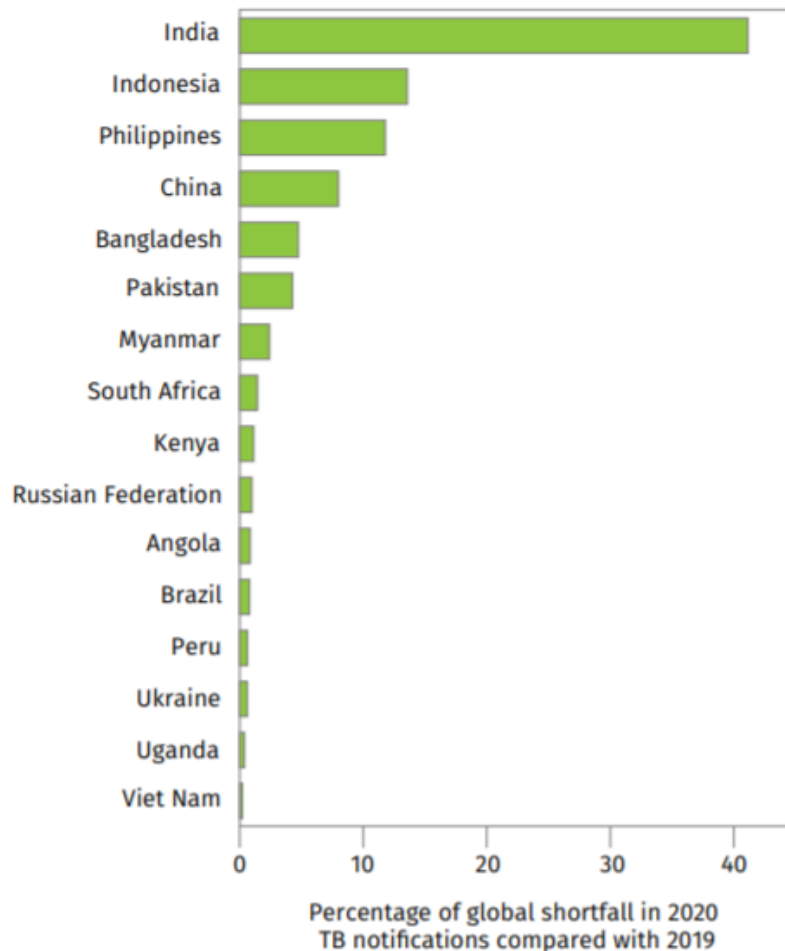


Figura 2: Lista dei 16 Paesi che hanno presentato la maggior percentuale di riduzione di notifiche di TB tra il 2019 e il 2020 [1]



Eziologia

L'agente eziologico della tubercolosi appartiene a *Mycobacterium tuberculosis* complex, che comprende 9 specie distinte, di cui sette patogene per l'uomo: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium orygis* e *Mycobacterium canetti*. *M. tuberculosis* è responsabile della maggior parte dei casi di tubercolosi umana. *M. bovis* è attualmente causa di malattia solo in pochi casi a livello mondiale ed è trasmesso dal latte bovino non pastorizzato; *M. caprae* vi è strettamente correlato. *M. africanum* è legato principalmente a casi dell'Africa occidentale, centrale e orientale. *M. microti* è patogeno principalmente per i roditori, ma è occasionalmente responsabile anche di infezione umana, così come *M. pinnipedii* che infetta otarie e foche nell'emisfero meridionale, ma è stato recentemente correlato a malattia di origine zoonotica in pazienti con acquisizione professionale dell'infezione. *M. mungi* è patogeno per le

manguste nell’Africa meridionale. *M. orygis* è un potenziale patogeno per l’uomo ed è stato riscontrato recentemente in bovidi di Africa e Asia. *M. canetti* è raramente causa di infezione ed è stato riscontrato in casi diagnosticati in Africa orientale [2], [3].

M. tuberculosis appartiene alla famiglia *Mycobacteriaceae*, ordine Actinomycetales; bastoncello immobile di 1-4 x 0,3-0,6 mm, privo di ciglia e capsula, asporigeno, aerobio stretto, alcol-acido resistente alla colorazione di Ziehl-Neelsen, specifica per i micobatteri, proprietà dovuta alla composizione della parete cellulare, ricca di lipidi strettamente legati all’arabinogalattomannano e ai peptidoglicani. Il tempo medio di duplicazione è di 15-20 ore, con tempo medio di crescita su mezzi solidi di 3-8 settimane.

Epidemiologia

Epidemiologia mondiale

A causa della pandemia COVID-19, si è assistito a una riduzione dei casi di TB riportati a livello mondiale. Questo ha riguardato in particolare 5 delle 6 regioni WHO, in particolare South-East Asia e Western Pacific; i Paesi che hanno contribuito maggiormente alla riduzione dei nuovi casi riportati sono stati India (41%), Indonesia (14%), Filippine (12%) e Cina (8%).

La riduzione dei casi tra il 2019 e il 2020 riflette la crisi dei Sistemi Sanitari in corso di pandemia COVID, sia in termini di riduzione dei servizi, sia in termini di incapacità di accesso agli stessi a causa di *lockdown* e restrizioni, oltre che dei mancati accessi legati alla paura del contagio COVID e alla paura dello stigma correlato alla sovrapposizione tra i sintomi della TB e del COVID stesso.

In figura 3 è riportata la stima dell’incidenza di TB nei vari Paesi; in particolare, secondo il report WHO 2020, circa 10 milioni di persone risultano affette da TB attiva nel 2019 (56% maschi, 32% femmine, 12% bambini di età inferiore a 15 anni). Circa l’8.2% dei pazienti affetti da TB presentano un’infezione da HIV. Nella figura 4 sono riportati i Paesi con un’incidenza di TB stimata inferiore a 10 su 100.000 abitanti e nella figura 5 i Paesi che contribuiscono ai due terzi dei casi totali di TB.

Nel 2020, WHO stima che si siano verificate 1.3 milioni di morti per TB tra soggetti HIV negativi e 214.000 in soggetti HIV positivi.

In base all’ultimo report del 2019, relativo alle cause di morte a livello globale (figura 6), la TB era la tredicesima causa di morte. Nel 2020, è la seconda causa di morte da singolo agente infettivo, dopo COVID-19 [4].

Dal punto di vista dell’impatto sulla Salute Pubblica, un ruolo a parte è rivestito dalle forme di TB resistenti agli antibiotici (figura 7). Si definisce *multidrug-resistant TB* (MDR-TB) la TB resistente a

isoniazide e rifampicina, i due farmaci di prima linea più efficaci, che richiede, come nel caso di forme resistenti alla sola rifampicina (*rifampicin-resistant TB*, RR-TB), l'utilizzo di farmaci di seconda linea. Recentemente (gennaio 2021), WHO ha fornito nuove definizioni per le forme di TB pre-XDR e XDR - pre-XDR-TB: ceppi di *M. tuberculosis* che oltre a presentare resistenza a isoniazide e rifampicina o a sola rifampicina sono resistenti a fluorochinoloni.

- XDR-TB: ceppi di *M. tuberculosis* che oltre a presentare resistenza a isoniazide e rifampicina o a sola rifampicina sono resistenti a fluorochinoloni e almeno un altro farmaco del gruppo A, che comprende, oltre che i fluorochinoloni (levofloxacina e moxifloxacina), bedaquilina e linezolid [5].

Si stima che tra le nuove diagnosi di TB, le forme MDR e RR siano globalmente circa il 3–4%, mentre tra le forme già trattate il 18–21%. La percentuale più alta si registra nei Paesi dell'ex Unione Sovietica (>50% delle TB precedentemente trattate) [1].

Nel 2020, globalmente, i test per determinare la resistenza alla rifampicina sono stati effettuati nel 71% (2.1/3.0 milioni) dei casi diagnosticati, nel 2019 nel 61% (2.2/3.6 milioni) e nel 2018 nel 50% (1.7/3.4 milioni). Tra questi sono stati individuate 132.222 casi di MDR/RR-TB e 25.681 casi di pre-XDR-TB o XDR-TB, per un totale di 157.903 [1]. In figura 8 sono riportati gli *outcome* registrati nei vari anni per le varie forme di TB [6]

Figura 3: stima dei casi di TB nel 2020 [1]

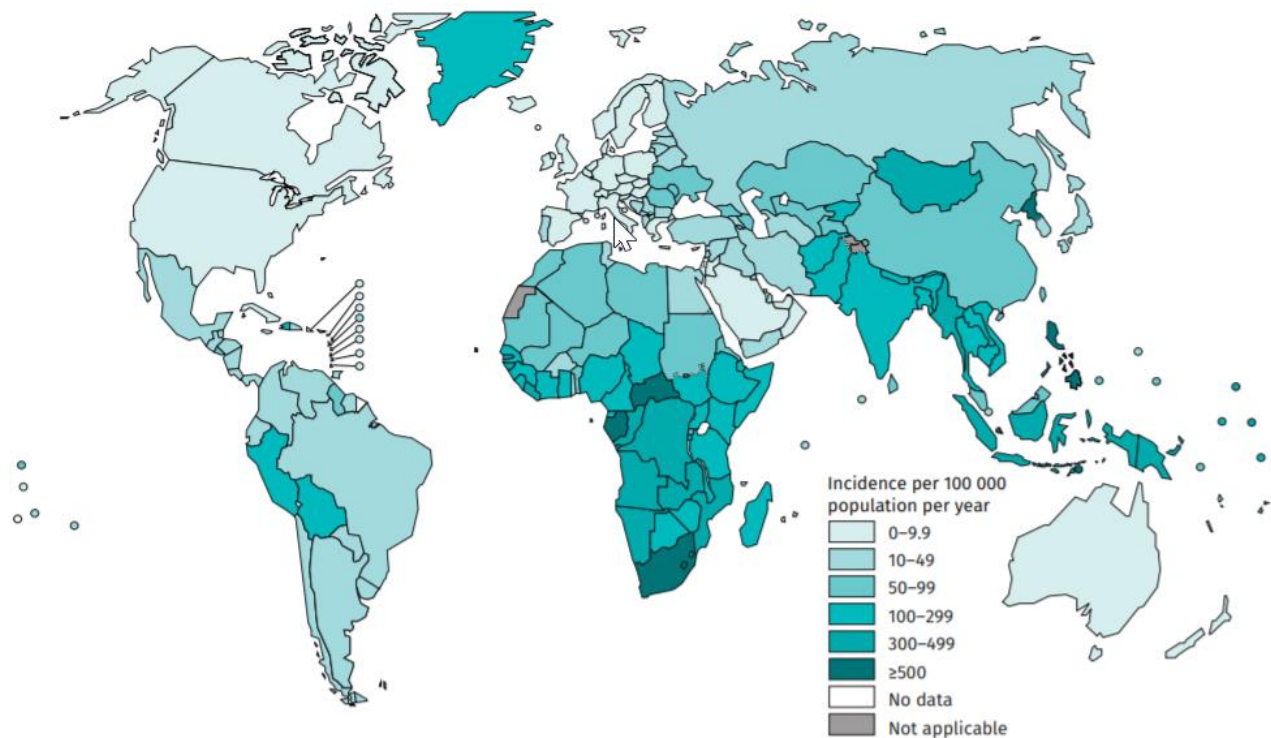


Figura 4: Paesi con un'incidenza stimata di TB inferiore a 10 per 100.000 abitanti nel 2019 [6]

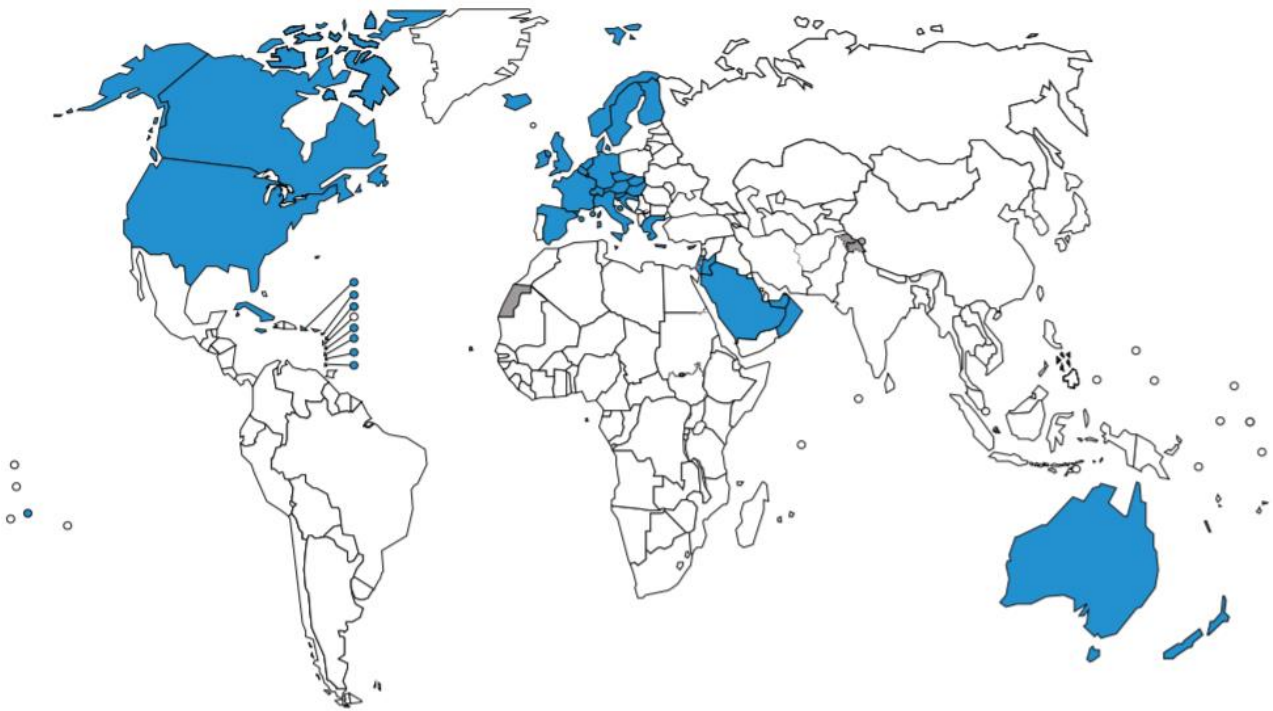


Figura 5: Paesi con un'incidenza stimata di TB nel 2020 di almeno 100.000 [1]

The eight countries that rank first to eighth in terms of numbers of cases, and that accounted for two thirds of global cases in 2020, are labelled.

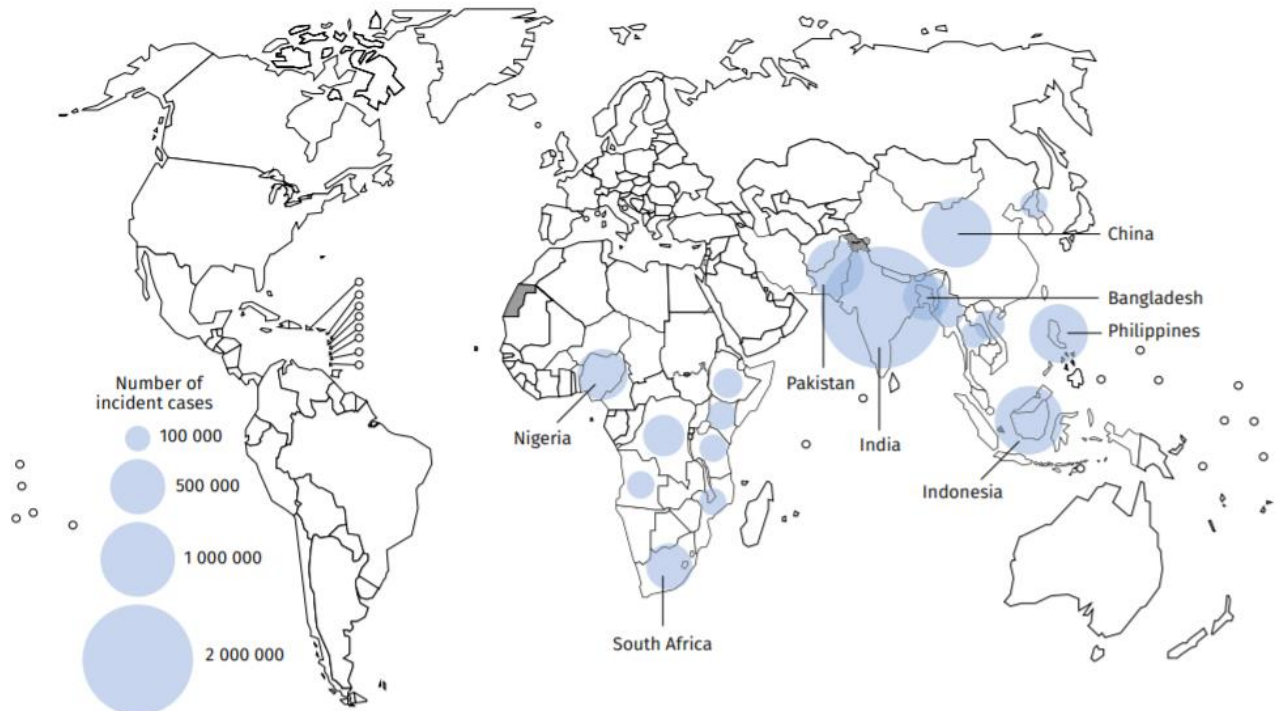


Figura 6: Principali cause di decesso a livello mondiale nel 2019. In grigio i decessi per TB tra soggetti HIV positivi [4]

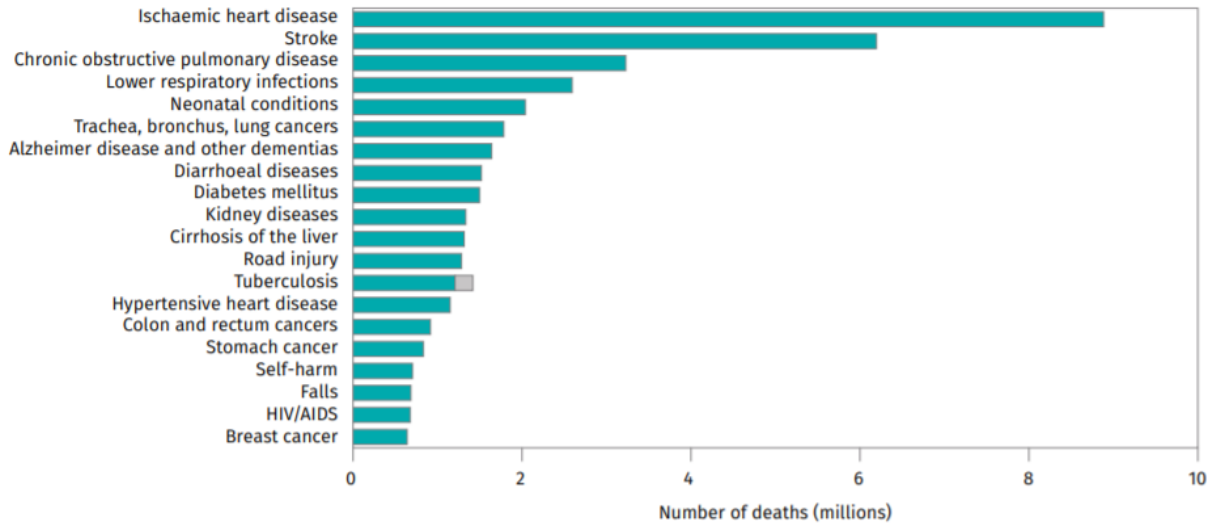


Figura 7: nuovi casi di TB MDR/RR-TB (stima 2020) [1]

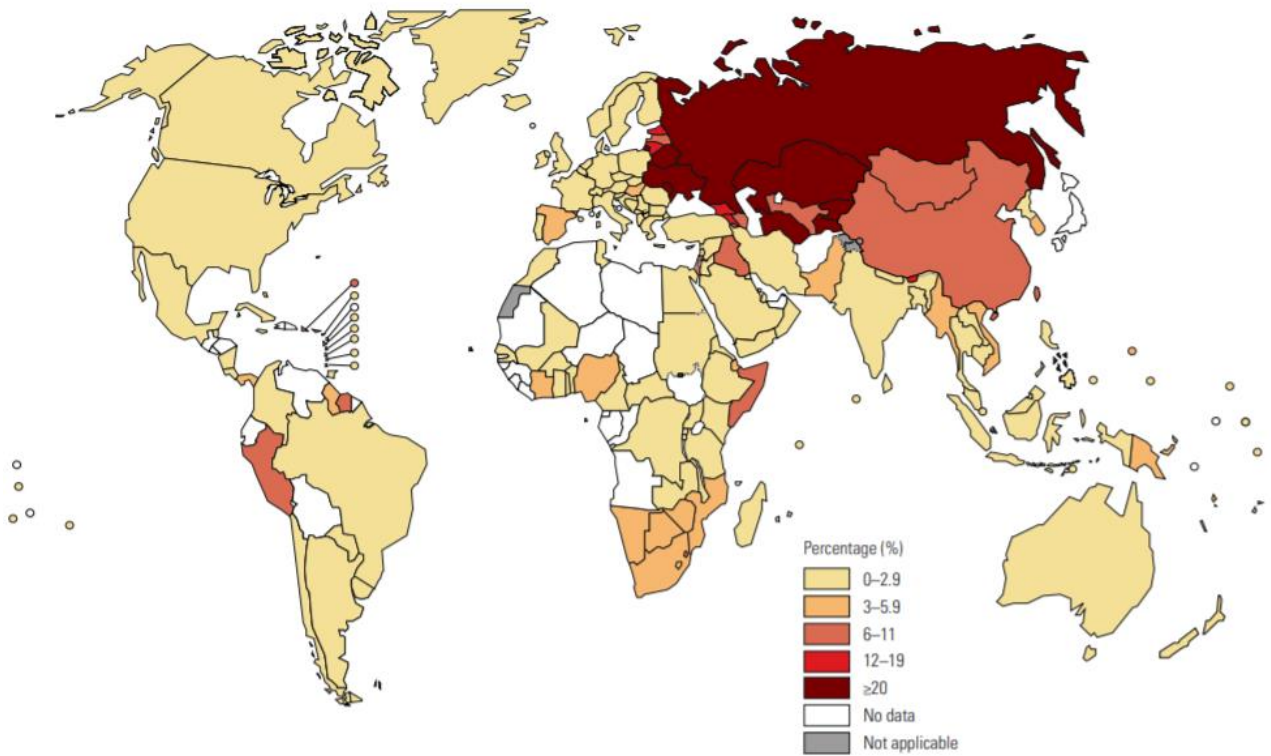
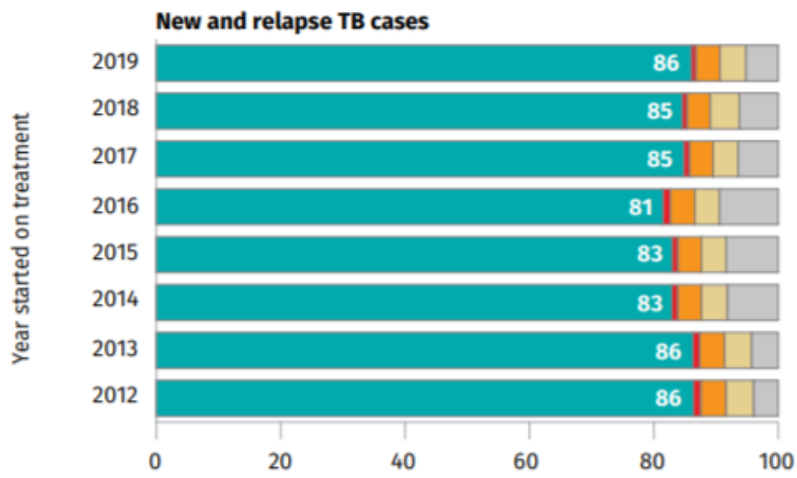
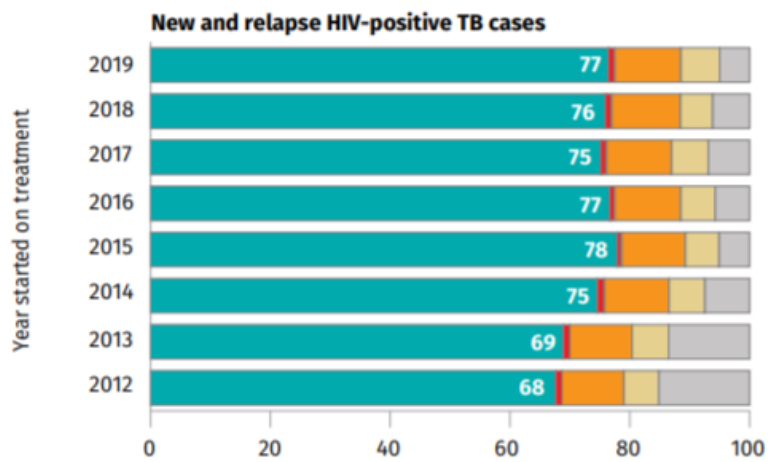


Figura 8: Outcomes di trattamento per i nuovi casi e le recidive di TB tra il 2012 e il 2019 a) nei soggetti HIV negativi, b) nei soggetti HIV positivi, c) forme MDR/RR [6]

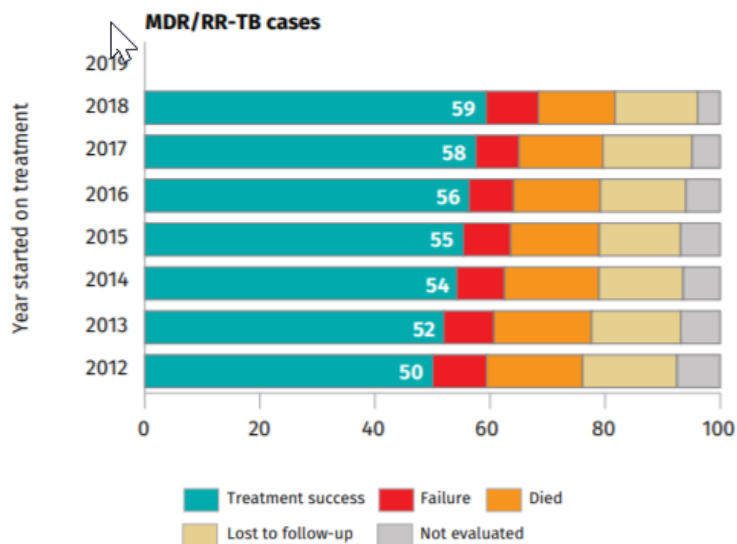
a)



b)



c)



Epidemiologia europea

Nel 2019, nei 29 Paesi dell'Unione Europea e dell'*European Economic Area* (EU/EEA) (Lettonia e Liechtenstein non hanno effettuato un report dei dati) sono stati riportati 49.752 casi di TB con un tasso di notifica del 9.6 per 100.000 abitanti (figura 9). Tra i nuovi casi e i *relapse* di TB, il 65.3% era costituito da soggetti tra 25 e 64 anni, mentre i bambini con meno di 15 anni rappresentavano il 4.1%. La Romania ha riportato il più alto tasso tra i bambini (14.1 per 100 000 nella popolazione 0-4 anni). Circa il 34.5% dei casi di TB in EU/EEA era rappresentato da stranieri. La percentuale di forme multiresistenti è del 3.4%, con più alte percentuali in Estonia (21.3%) e Lituania (17.0%). I casi XDR TB sono circa il 20-25% dei casi di MDR testati per i farmaci di seconda linea. Lituania e Romania rappresentano il 75% dei casi XDR nel 2019 (figura 10). Al *follow up*, dei 42 811 casi di TB notificati nel 2018, 63.7% hanno concluso il trattamento, 6.7% sono morti e 0.8% non hanno riposto al trattamento prescritto. Per i trattamenti di forme MDR, il 45.7% è stato trattato con successo, il 15.2% è morto e l'11.0% non ha risposto al trattamento; le percentuali per le forme XDR sono state rispettivamente del 34.9%, 26.2% e 18.0% [7].

Figura 9: Tasso di notifica di nuovi casi di TB e di recidive per 100.000 abitanti, 2019 [7]

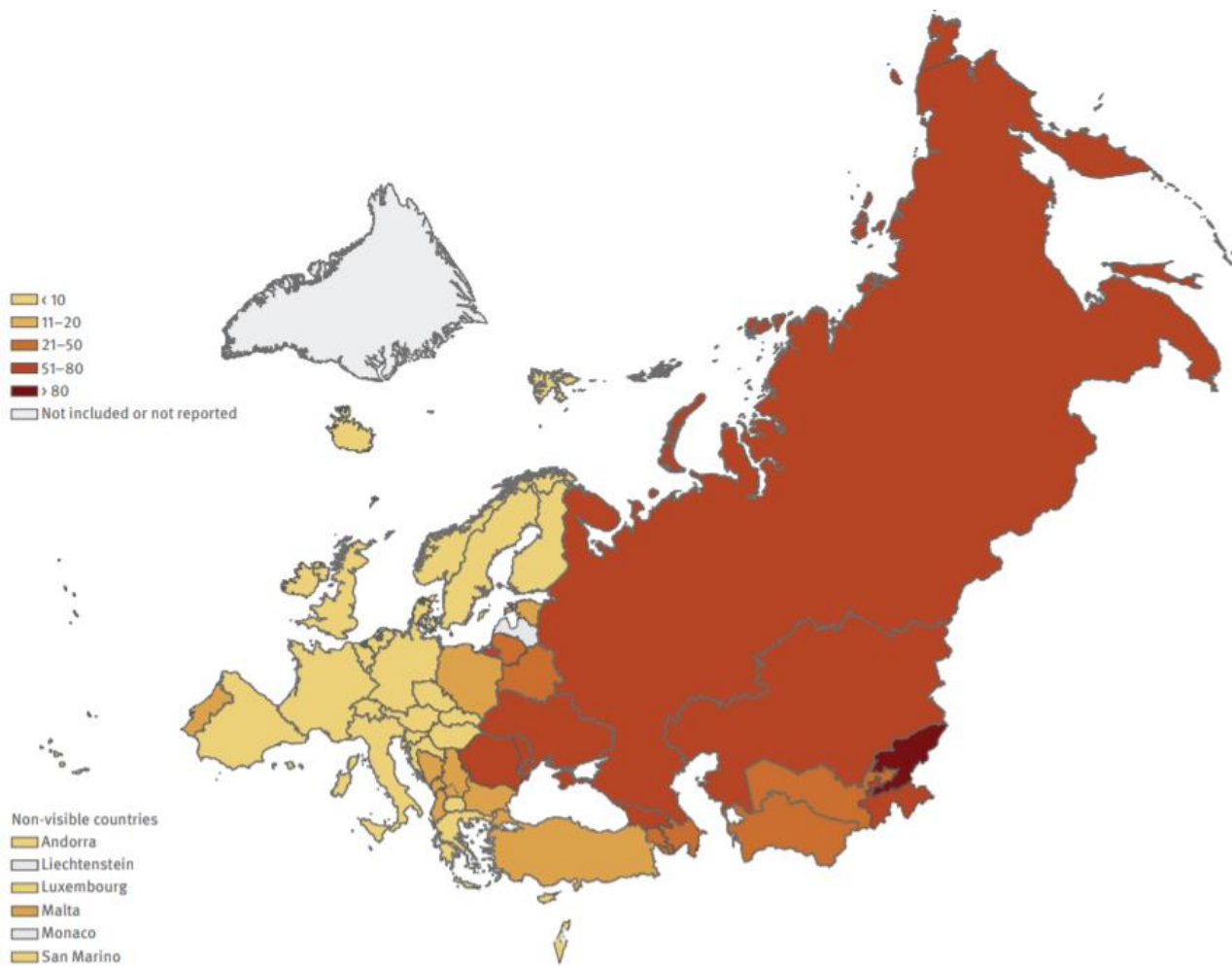
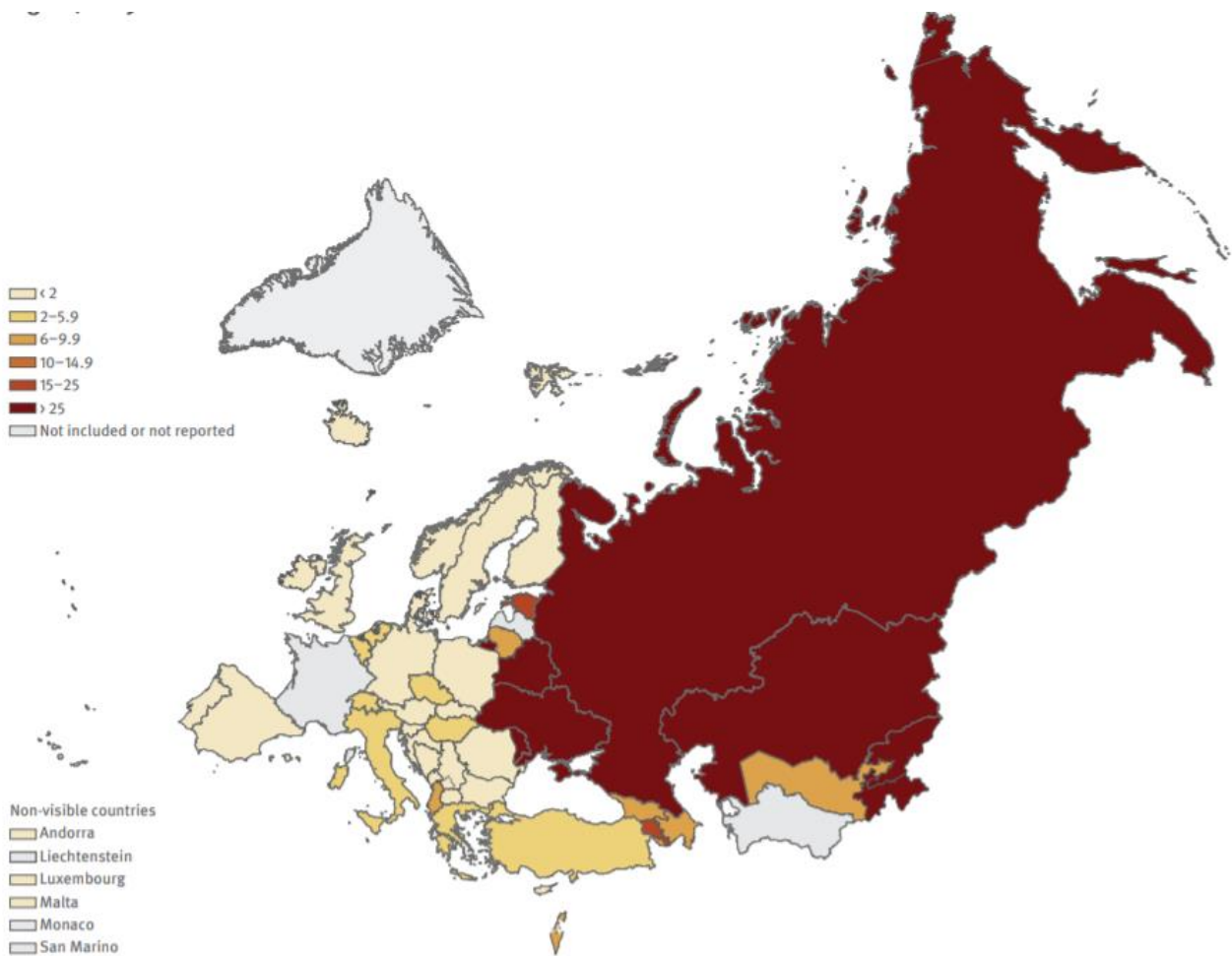


Figura 10: Percentuale di casi di TB MDR nel 2019 [7]



Epidemiologia italiana

Secondo i dati dell'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) [7], nel 2019, in Italia, i casi di TB sono stati 3346 (pari al 5.5 per 100.000 abitanti), di cui 1882 stranieri (56.2%). I casi MDR notificati sono stati 38 (2.2%), di cui 2 XDR. In figura 11, sono riportati i casi di TB MDR nel periodo 2010-2019, suddivisi in base a eventuali precedenti trattamenti effettuati.

In figura 12, si riporta l'andamento nel corso degli anni dei nuovi casi e delle recidive, stratificate per età (fig. 12a) e in base alla nazionalità, italiana o straniera (fig 12b): la fascia di età più interessata è quella compresa tra 15 e 44 anni e gli stranieri risultano prevalenti sugli italiani per quanto riguarda le diagnosi di TB.

Figura 11: casi di TB MDR 2010-2019 in Italia [7]

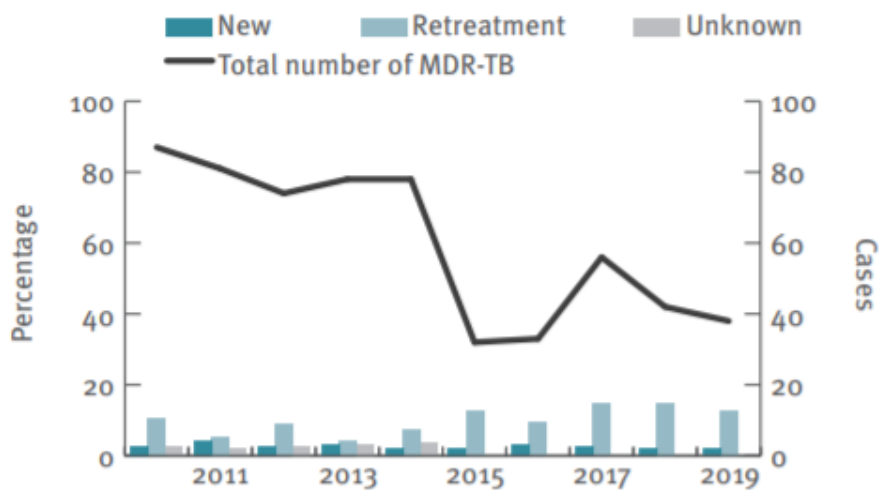
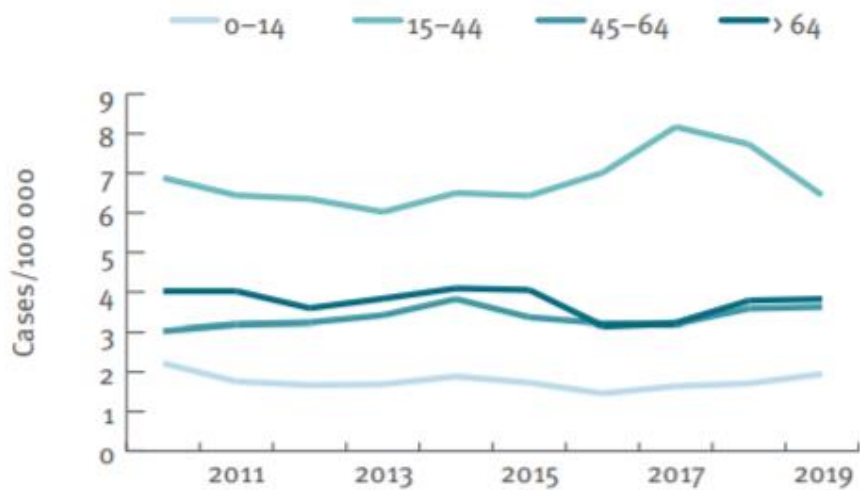
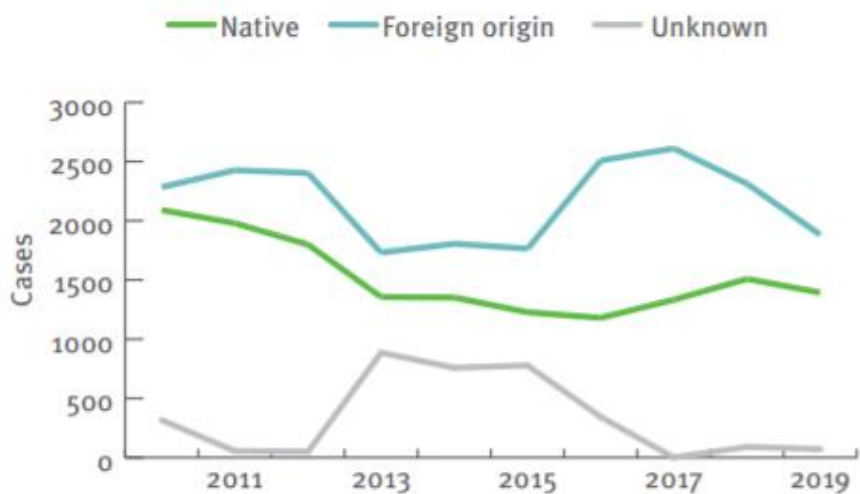


Figura 12 [7]:

a) Nuovi casi e recidive di TB, 2010-2019, suddivise in base all'età in Italia



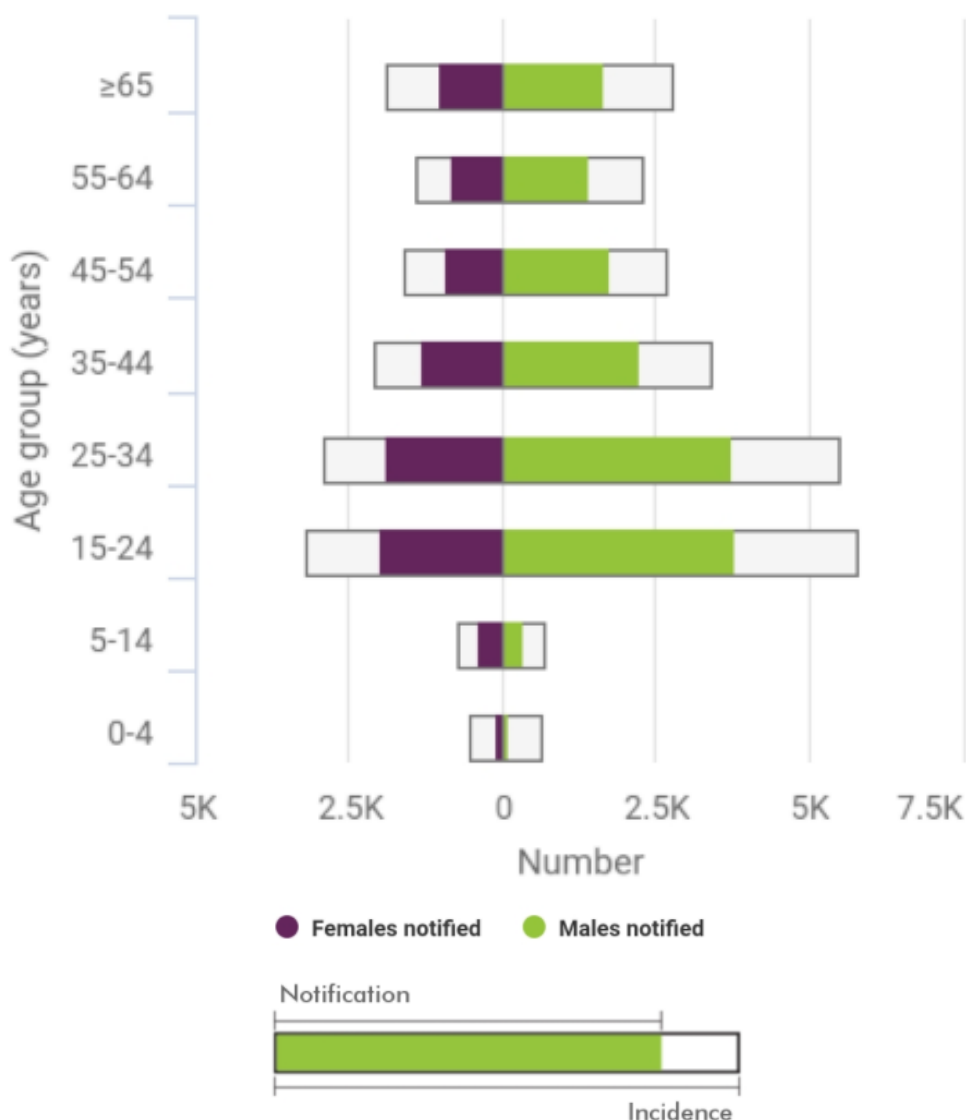
b) Nuovi casi e recidive di TB, 2010-2019, in Italia, suddivise in base alla nazionalità



Epidemiologia peruviana

Il Perù è un Paese del Sud-America ad alta incidenza di tubercolosi (116 casi per 100.000 abitanti, circa 38.000 casi stimati nel 2020) [1]. La distribuzione dei casi in base all'età e al sesso è mostrata nella figura 13. I casi confermati di TB MDR/RR sono stati circa 1500 e 116 pre-XDR/XDR, tali da portare il Perù a essere il primo dei Paesi del Latino America per casi riportati di MDR-TB. La maggior parte dei casi sono registrati nell'area metropolitana di Lima [8]. Una recente *survey* condotta dal 2014 al 2015, ha mostrato come su 1908 nuovi casi e 272 recidive, 638 (29.3%) presentassero resistenza ad almeno un farmaco di prima linea e come le MDR-TB fossero il 7.3% delle nuove diagnosi e il 16.2% delle recidive [9]. In Peru, la gestione della lotta alla TB è affidata alla *Tuberculosis Prevention and Control Directorate* (DPCTB), sotto la direzione del Ministro della Salute (MoH).

Figura 13: Incidenza stimata e casi notificati stratificati per età e sesso in Perù [1]



Epidemiologia fiorentina

Nel distretto sanitario di Firenze (Azienda Sanitaria Locale, ASL 10), dal 2002 al 2014 la percentuale di casi confermati di tubercolosi in soggetti nati all'estero è progressivamente aumentata e nel 2014 la percentuale è stata del 68,7%; di questi, il 18,2% erano migranti di origine peruviana [10]. In Italia, i migranti provenienti dal Perù rimangono la più grande comunità latino-americana con 90.570 residenti (2,5% dei migranti in Italia) [11]. Nel 2009, uno studio retrospettivo ha riportato un'incidenza stimata di tubercolosi tra i Peruviani nati a Firenze pari a 381 su 100.000, risultando circa 3 volte più elevata dell'incidenza stimata in Italia (117 su 100.000) e nel Paese di origine (113 su 100.000). Inoltre, lo studio ha rivelato la presenza di 12 *cluster*, correlata a una trasmissione attiva in atto all'interno della comunità [12].

Popolazione di origine peruviana in Italia

Secondo il rapporto del Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali, i cittadini originari del Perù regolarmente soggiornanti al 1° gennaio 2020 sono 90570, pari al 2.5% dei cittadini non comunitari in Italia. La comunità peruviana è una delle comunità straniere più stabilizzate, anche a causa della lunga storia di migrazione nel nostro Paese. Le caratteristiche demografiche di questa popolazione rilevano un 58.3% di soggetti di sesso femminile e un'età media di 37 anni. Dal punto di vista della distribuzione sul territorio, il 67% circa dei cittadini peruviani risiede nel Nord Italia: in Lombardia il 44% della comunità peruviana, in Piemonte il 12.2%. Il Lazio ospita il 16.3% della comunità. In Toscana, il 10.5% della comunità ha ricevuto o rinnovato il permesso di soggiorno [13].

M. tuberculosis lineages

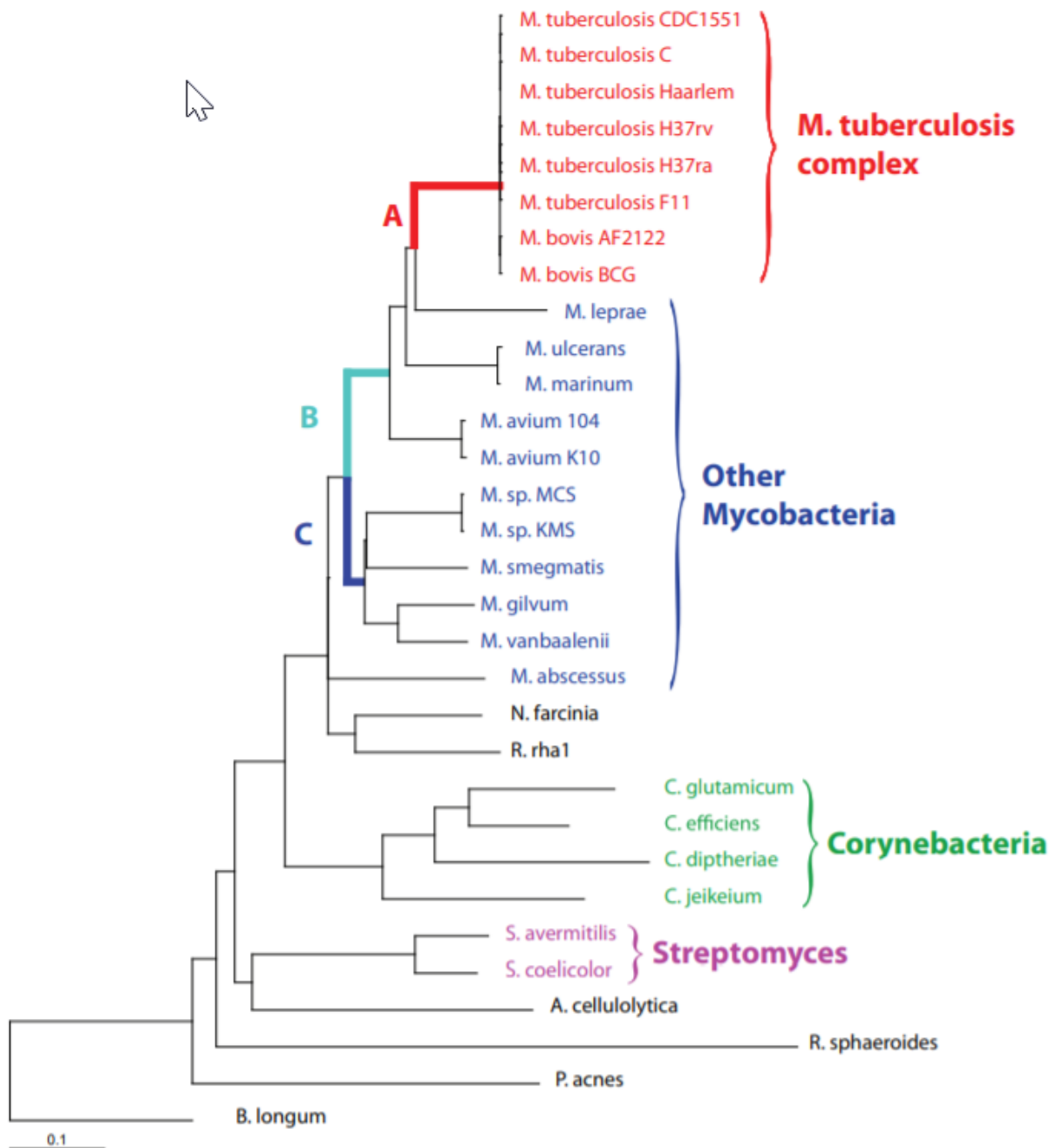
L'utilizzo delle tecniche di sequenziamento ha permesso di comprendere meglio l'origine, la storia e la trasmissione della malattia tubercolare. Nella figura 14, sono riportati i *clades* di *M. tuberculosis*, che inizialmente erano identificati in base all'area di prevalenza: Beijing (East Asia), CAS (central Asia), Haarlem, X, LAM (Latin American Mediterranean) [14]. Utilizzando il metodo di detezione di *large sequence polymorphisms* (LSPs) è possibile la classificazione in sei maggiori *lineages*, caratterizzati ciascuno da una singola ancestrale LSP comune a tutti gli isolati. I *lineages* sembrano a loro volta strettamente adattati a singole popolazioni. In figura 15, è riportato l'albero filogenetico di *M. tuberculosis* [15]: i micobatteri sono organismi prevalentemente ambientali, nei quali si sono verificate diverse transizioni che hanno portato a un'acquisizione di patogenicità, come nel caso di *M. tuberculosis complex*.

Figura 14: Clades di *M. tuberculosis* identificati mediante le principali metodiche in uso [14]

Evolutionary age (species)	Lineage name based on LSP/SNP ^b	Lineage and sublineage [RD associated]			Spoligotype family	
Ancient lineage (<i>M. tuberculosis</i>)	Indo-Oceanic lineage	1 [RD239]	1.1	1.1.1	EAI4 and EAI5	
					1.1.1.1	EAI4
					1.1.2	EAI5 and EAI3
					1.1.3	EAI6
				1.2	1.2.1	EAI2
					1.2.2	EAI1
				2.1 (non-Beijing)		MANU ancestor and orphan profile
				2.2 (Beijing) [RD105, RD207]	2.2.1 [RD181]	Beijing
					2.2.1.1 [RD150]	Beijing
					2.2.1.2 [RD142]	Beijing
Modern lineages (<i>M. tuberculosis</i>)	East-Asian lineage	2	3.1	3.1.1	Beijing	
				3.1.2	CAS except CAS1-Delhi	
				3.1.2.1	CAS1-Kili	
				3.1.2.2	CAS2	
				4.1.1 (X-type)	CAS	
				4.1.1.1 [RD183]	X2	
				4.1.1.2	X1	
				4.1.1.3 [RD193]	X3 and X1	
				4.1.2	T1 and H1	
				4.1.2.1 (Haarlem) [RD182]	T1 and H1	
	East African-Indian lineage	3 [RD750]	4.2	4.2.1 (Ural)	H3 and H4	
				4.2.2	LAM7-TUR and T1	
				4.2.2.1 (TUR) [RD182]	LAM7-TUR	
			4.3 (LAM)	4.3.1	LAM9	
				4.3.2	LAM3	
				4.3.2.1 [RD761]	LAM3	
				4.3.3 [RD115]	LAM9 and T5	
				4.3.4 [RD174]	LAM1	
				4.3.4.1	LAM11-ZWE, LAM9, LAM1, and LAM4	
				4.3.4.2	LAM11-ZWE	
Euro-American lineage	4	4.4	4.4.1	4.4.1.1 (S-type)		
				4.4.1.2		
			4.4.2	S		
				T1		
				T1 and T2		
			4.5 [RD122]	H3, H4, and T1		
			4.6	4.6.1 (Uganda) [RD724]	T2-Uganda	
				4.6.1.2	T2	
			4.6.2 [RD726]	4.6.2.1	T3	
				4.6.2.2 (Cameroon)	LAM10-CAM	
Ancient lineages (<i>M. africanum</i>)	West-Africa lineage 1	5 [RD711]	4.7		T1 and T5	
				4.8 [RD219]	T1, T2, T3, T4 and T5	
				4.9 (H37Rv-like)	T1	
Intermediary lineage (<i>M. tuberculosis</i>)	West-Africa lineage 2	6 [RD702]			AFRI_2 and AFRI_3	
					AFRI_1	

^aRegions of deletion (RD) are given in brackets and appear below the lineage/sublineage in which they are present. Synthetic table adapted from Coll et al. (86).
^bLSP, large sequence polymorphism.

Figura 15: Albero filogenetico dei micobatteri e dei correlati Actinomyceti [15]: A: Ramo che porta all'MTBC; B: Ramo che porta ai micobatteri patogeni; C: Ramo che porta ai micobatteri non patogeni che si ritrovano nell'ambiente



Trasmissione e patogenesi

Trasmissione

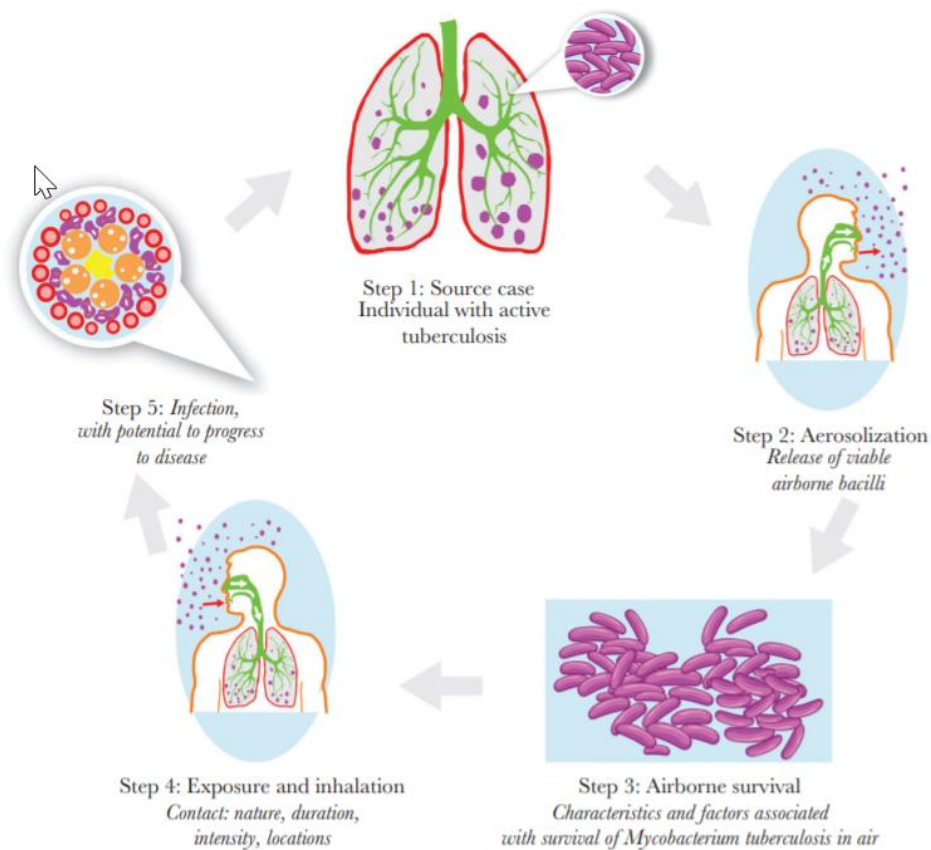
La trasmissione di *M. tuberculosis* si verifica quasi esclusivamente per via aerogena, attraverso l'emissione, da parte di una persona affetta da tubercolosi polmonare bacillifera, dei droplet nuclei, emessi attraverso colpi di tosse, starnuti o anche semplicemente parlando. I droplet nuclei sono goccioline microscopiche di saliva, di diametro inferiore a 5 μm , che possono contenere i micobatteri e che possono rimanere sospese nell'aria per molti minuti, contaminando un'intera stanza. Altra via di trasmissione, sebbene meno significativa, può essere rappresentata da latte di bovini infetti. La malattia può colpire qualsiasi organo e/o apparato, anche se la forma tubercolare risulta quella più frequente.

La probabilità di trasmissione è influenzata da vari fattori [16]:

- La suscettibilità del soggetto esposto (esempio soggetti immunodepressi)
- Il grado di contagiosità del caso, definita ad esempio dal numero di bacilli espulsi nell'ambiente, dalla presenza di sintomi respiratori, dalla presenza di cavitazioni alla radiografia del torace.
- Caratteristiche legate all'ambiente in cui avviene il contatto: dimensioni del luogo, ventilazione, concentrazione di droplet nuclei
- Durata, frequenza dell'esposizione e prossimità fisica alla persona infetta

La modalità di trasmissione è esemplificata in figura 16 [17].

Figura 16: Trasmissione della TB [17]



Patogenesi della malattia tubercolare

I droplet nuclei tendono a depositarsi a livello dei lobi polmonari superiori nella loro porzione inferiore e nelle porzioni superiori del lobo medio e inferiore, dove il flusso d'aria maggiore favorisce la deposizione. Giunti negli alveoli i micobatteri sono fagocitati dai macrofagi, potenzialmente capaci di eliminare i bacilli. Il bacillo tubercolare tende a evadere la risposta immunitaria e a impedire la maturazione del fagolisosoma e provocando la lisi macrofagica e l'attivazione di altri fagociti che, ingerendo i macrofagi distrutti, si infettano a loro volta e sono responsabili della disseminazione dell'infezione attraverso il flusso linfatico.

L'ipersensibilità di tipo ritardato è un processo, mediato principalmente dai linfociti T-citotossici, che distrugge i macrofagi inattivati contenenti i micobatteri che si moltiplicano al loro interno e che è responsabile della formazione della tipica lesione caseosa. La risposta cellulo-mediata, veicolata da linfociti T-helper, determina l'attivazione dei macrofagi e li rende capaci di distruggere e digerire i micobatteri fagocitati. La formazione del granuloma è conseguente all'organizzazione di linfociti, macrofagi, cellule giganti di Langhans, fibroblasti e capillari e al suo interno i bacilli possono sopravvivere metabolicamente inattivi. Nel 10% dei casi il sistema immunitario può non essere in

grado di contenere l'infezione e si può presentare una tubercolosi primaria. Si parla invece di tubercolosi postprimaria nel caso di riattivazione tubercolare conseguente a condizioni di immunocompromissione [3], [16].

Diagnosi di laboratorio

In base al sospetto clinico di tubercolosi, è necessario adottare il corretto iter diagnostico per la conferma microbiologica. La diagnostica microbiologica si basa sull'utilizzo di:

- Esame microscopico diretto;
- Esame colturale;
- Test di amplificazione genica;
- Test di suscettibilità ai farmaci.

Le indagini microbiologiche per la ricerca dei micobatteri possono essere eseguite su qualsiasi tipo di materiale biologico [18].

L'esame microscopico diretto è un test rapido che permette di evidenziare i micobatteri, con bassa sensibilità, eseguibile su tutti i materiali biologici, la cui positività è data dalla presenza di bacilli alcol-acido resistenti nel campo visivo. Le metodiche utilizzabili sono la colorazione di Ziehl-Neelsen e la colorazione in fluorescenza. Nella colorazione di Ziehl-Neelsen i micobatteri appariranno di colore rosso, gli altri batteri e lo sfondo di colore blu. Nella colorazione in fluorescenza all'osservazione microscopica, i micobatteri appaiono fluorescenti in giallo contro lo sfondo scuro.

La tecnica LED (*Light Emitting Diode*) utilizza diodi a emissione luminosa e ha una sensibilità maggiore del 6%, senza una perdita apprezzabile in specificità, se messa a confronto con la metodica di Ziehl-Neelsen diretta, nonché una sensibilità maggiore del 5% e una specificità maggiore dell'1%, rispetto alla microscopia a fluorescenza tradizionale [19]. L'esame microscopico diretto permette di ottenere i risultati in poche ore, è semplice da eseguire ed economico. Necessita di una concentrazione di micobatteri non inferiore a 10.000/ml e non permette di distinguere *M. tuberculosis* e gli altri micobatteri.

L'esame colturale rappresenta il *gold standard* per la diagnosi di TB: il terreno liquido ha alta specificità, ma è gravato dal rischio di contaminazione batterica; il terreno solido ha bassa sensibilità e richiede tempi lunghi di coltura. L'utilizzo combinato dei due terreni migliora la sensibilità.

Tra i terreni solidi i più utilizzati sono il terreno di Lowenstein-Jensen e i terreni agarizzati Middelbrook 7H10 e Middelbrook 7H11. I tempi di coltura variano dalle 3 alle 8 settimane, mentre il tempo di crescita sui terreni liquidi è di 7-21 giorni.

I test di amplificazione genica (NAATs, *Nucleic Acid Amplification Tests*) sono eseguiti direttamente sul campione e discriminano in tempi molto rapidi i micobatteri tubercolari dai non tubercolari. I test di amplificazione genica più appropriati sono l'Hologic Amplified Mycobacteria Tuberculosis Direct test (MTD) e il Cepheid Xpert MTB/RIF test.

La WHO raccomanda l'utilizzo di Xpert MTB/RIF5, essendo un test rapido che può essere eseguito anche da operatori poco esperti. L'Xpert MTB/RIF è un NAAT completamente automatizzato che permette di verificare nel campione la presenza di micobatteri appartenenti a *M. tuberculosis* complex e l'eventuale resistenza alla rifampicina. L'esame si basa sull'utilizzo di una cartuccia (Xpert cartridge), processata da un apposito apparecchio (GeneXpert instrument). L'apparecchio esegue, attraverso tecnica PCR, l'amplificazione della regione del gene *rpoB*, regione determinante la resistenza a rifampicina in più del 95% dei casi di resistenza.

In individui positivi all'esame microscopico diretto, la positività del test di amplificazione genica indica la presenza di *M. tuberculosis* complex e conferma la diagnosi di tubercolosi attiva.

Attualmente il *gold standard* per la determinazione della sensibilità del *M. tuberculosis* ai farmaci è l'antibiogramma (DST, *Drug Susceptibility Testing*). Negli USA l'agar proportion method è il più utilizzato. Il metodo MGIT (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*), utilizzato anche in Italia, è un sistema standardizzato, semiautomatico, che utilizza mezzi liquidi per fornire informazioni sulla resistenza ai farmaci di prima linea utilizzando un'apposita strumentazione (Becton-Dickinson MGIT 960 instrumentation) [20], [21].

In figura 17 sono riportati i test utilizzabili e il loro tempo di *performance* [22]: utilizzando le tecniche tradizionali, per ottenere un test di sensibilità ai farmaci di prima linea sono necessarie circa 4 settimane.

Figura 17: test per diagnosi di TB [22]

Test	Time Required
I. Nucleic acid amplification test, detection (NAAT-TB)	1 d
II. Nucleic acid amplification test, resistance markers (NAAT-R)	1–2 d
III. Acid-fast bacilli microscopy	1 d
IV. Growth detection	Up to 6–8 wk (average 10–14 d)
Liquid	(average 10–14 d)
Solid	(average 3–4 wk)
V. Identification of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex by DNA probe or HPLC	1 d ^a
VI. First-line drug susceptibility testing (liquid medium)	1 to 2 wk ^a
VII. Second-line and novel compound drug susceptibility testing	
i. Liquid (broth-based) medium	1 to 2 wk ^a
ii. Solid (agar- or egg-based) medium	3 to 4 wk ^a

Abbreviation: HPLC, high-performance liquid chromatography.^aAfter detection of growth.

Whole genome sequencing

Nelle ultime decadi, i test molecolari sono stati utilizzati per identificare le trasmissioni e le modalità di contagio all'interno di una popolazione, oltre che a differenziare tra riattivazioni e nuove infezioni e hanno permesso di identificare contagi non individuati dalle comuni indagini epidemiologiche [23]. Questo spesso accade per trasmissioni avvenute all'interno di un "social network" (esempio *homeless*, tossicodipendenti, soggetti con abuso di alcol, etc) [24] [25] e, una volta individuati, le azioni di Salute Pubblica possono essere rivolte alla risoluzione della problematica alla base della trasmissione stessa, per evitare l'ulteriore diffusione dei contagi. La genotipizzazione può essere d'aiuto a identificare falsi positivi legati a cross-contaminazioni di laboratorio, a identificare *cluster* di TB, effettuare *contact tracing*, a discernere tra nuove infezioni e riattivazioni e a identificare le modalità di trasmissione all'interno di una comunità [26][27]–[29].

L'uso dell'analisi di genotipizzazione (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable Number Tandem Repeat*-MIRU-VNTR) necessita di conferma epidemiologica e non chiarisce il modello di trasmissione. Il *whole-genome sequencing* (WGS) può rilevare la microevoluzione all'interno dei *lineages* di *Mycobacterium tuberculosis*. Lo schema delle mutazioni accumulate può suggerire la direzione della trasmissione durante un'epidemia [30]–[33]. Diversi studi hanno dimostrato l'utilità di WGS nel contesto di indagini epidemiologiche [34]–[36], suggerendo che il WGS migliora l'accuratezza, individua falsi *cluster* e permette di ottenere un risparmio di risorse [34]. I tassi di mutazione di *M. tuberculosis* sono stimati come 0,5 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) per

genoma all'anno e una differenza di meno di 6 SNP per ceppi da trasmissione diretta da uomo a uomo è stata proposta per suggerire una trasmissione recente [37].

Un recente studio pilota dell'ECDC, che ha coinvolto 28 Paesi europei, ha evidenziato come l'utilizzo del WGS sia utile per evidenziare la presenza di cluster nazionali ma anche tra Paesi e ha confermato il suo potenziale utilizzo in associazione ai dati epidemiologici nel fornire informazioni relative alla dinamica della trasmissione della TB [38]

Il WGS permette inoltre di ottenere in tempi più rapidi rispetto alle tecniche tradizionali informazioni relative a determinanti di resistenza nei confronti di farmaci antitubercolari di I e II linea, con un valore predittivo negativo del 100% nei confronti di ceppi MDR e del circa 96% per i farmaci di I linea in *setting* a bassa incidenza di MDR [30]. Questo dato permetterebbe di intraprendere precocemente un trattamento antitubercolare in attesa della conferma dei test fenotipici [39].

Diagnosi radiologica

Nel sospetto di tubercolosi attiva, l'esame consigliato è la radiografia del torace, da completare, in caso di reperti dubbi o soggetti immunocompromessi, con una tomografia computerizzata del torace (TC).

La sensibilità della metodica è alta, per quanto la specificità sia bassa, a causa della necessità di diagnosi differenziale con altre infezioni polmonari non tubercolari. La TC torace aumenta la specificità della diagnosi, evidenziando la presenza di reperti più specifici, quali le cavitazioni e l'aspetto ad albero in fiore, oltre a essere dirimente in caso di radiografia del torace dubbia [40].

I segni radiologici più tipici sono [41]–[45]:

- complesso primario (di Ghon): riscontro di una piccola opacità parenchimale circoscritta di tipo alveolare (zona di necrosi caseosa), con adenopatia consensuale, solitamente unilaterale.
- noduli centrolobulari scarsamente definiti e aspetto ad albero in fiore in un'area di parenchima adiacente al consolidamento, segni di una diffusione broncogena della malattia.
- infiltrato tisiogeno precoce di Assman-Redecker, un'alveolite essudativa specifica circoscritta, che si presenta come un'opacità tenue, rotondeggiante, solitamente sottoclaveare (andando tipicamente a interessare il segmento posteriore del lobo superiore), non accompagnata da adenopatia ilare consensuale. Il processo essudativo può

estendersi a un intero lobo (lobite tubercolare) e generare un quadro multicavitario, essendovi rapida tendenza alla necrosi e all'ulcerazione.

- broncopolmonite a localizzazioni multiple, nella quale si possono osservare opacità disseminate bilateralmente, con quadro evolutivo rapido e grave, dominato da fenomeni di cavitazione.
- Forme miliari, che si caratterizzano per la presenza di granulomi tubercolari costituiti da tubercoli miliari; possono essere diffuse o circoscritte, con variabile estensione e sede. Il quadro radiologico è caratterizzato da opacità nodulari ben definite, talora confluenti, con essudazione perifocale.

Terapia della tubercolosi

La terapia antitubercolare si prefigge tre obiettivi principali:

- 1- Ridurre rapidamente il numero di bacilli attivi, riducendo in questo modo la gravità della malattia, riducendo il rischio di decesso e bloccando la trasmissione
- 2- Eradicare la popolazione di bacilli persistenti con lo scopo di evitare le recidive dopo il termine del trattamento
- 3- Prevenire l'induzione di resistenza ai farmaci durante il trattamento

È ampiamente dimostrato da studi clinici che sia necessario a tal fine utilizzare un regime di combinazione, cercando di ridurre il rischio di tossicità e aumentare la probabilità di completare il trattamento [46], [47]. Il maggior rischio di recidiva si verifica nei casi di malattia più estesa e nei pazienti con negativizzazione dei colturali più lunga [48].

Terapia delle forme sensibili ai farmaci di prima linea

Il trattamento della TB con suscettibilità ai farmaci di prima linea è stato recentemente revisionato dalle società scientifiche americane *American Thoracic Society (ATS)*, *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, *Infectious Diseases Society of America (IDSA)* [49]. Nella figura 18, sono riportati gli schemi terapeutici raccomandati per il trattamento. Il regime da preferire per il trattamento dell'adulto è quello costituito da una fase intensiva di due mesi con associazione di isoniazide (INH), rifampicina (RIF), pirazinamide (PZA) e etambutolo (EMB), seguito da una fase di mantenimento di 4 mesi con INH e RIF.

Figura 18: Regimi terapeutici consigliati per TB sensibile ai farmaci di I linea [49]

Regimen	Drug ^a	Intensive Phase	Continuation Phase		Range of Total Doses	Comments ^{c,d}	Regimen Effectiveness
		Interval and Dose ^b (Minimum Duration)	Drugs	Interval and Dose ^{b,c} (Minimum Duration)			
1	INH RIF PZA EMB	7 d/wk for 56 doses (8 wk), or 5 d/wk for 40 doses (8 wk)	INH RIF	7 d/wk for 126 doses (18 wk), or 5 d/wk for 90 doses (18 wk)	182–130	This is the preferred regimen for patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis.	
2	INH RIF PZA EMB	7 d/wk for 56 doses (8 wk), or 5 d/wk for 40 doses (8 wk)	INH RIF	3 times weekly for 54 doses (18 wk)	110–94	Preferred alternative regimen in situations in which more frequent DOT during continuation phase is difficult to achieve.	
3	INH RIF PZA EMB	3 times weekly for 24 doses (8 wk)	INH RIF	3 times weekly for 54 doses (18 wk)	78	Use regimen with caution in patients with HIV and/or cavitary disease. Missed doses can lead to treatment failure, relapse, and acquired drug resistance.	
4	INH RIF PZA EMB	7 d/wk for 14 doses then twice weekly for 12 doses ^e	INH RIF	Twice weekly for 36 doses (18 wk)	62	Do not use twice-weekly regimens in HIV-infected patients or patients with smear-positive and/or cavitary disease. If doses are missed, then therapy is equivalent to once weekly, which is inferior.	

Abbreviations: DOT, directly observed therapy; EMB, ethambutol; HIV, human immunodeficiency virus; INH, isoniazid; PZA, pyrazinamide; RIF, rifampin.

^a Other combinations may be appropriate in certain circumstances; additional details are provided in the section "Recommended Treatment Regimens."

^b When DOT is used, drugs may be given 5 days per week and the necessary number of doses adjusted accordingly. Although there are no studies that compare 5 with 7 daily doses, extensive experience indicates this would be an effective practice. DOT should be used when drugs are administered <7 days per week.

^c Based on expert opinion, patients with cavitation on initial chest radiograph and positive cultures at completion of 2 months of therapy should receive a 7-month (31-week) continuation phase.

^d Pyridoxine (vitamin B6), 25–50 mg/day, is given with INH to all persons at risk of neuropathy (eg, pregnant women; breastfeeding infants; persons with HIV; patients with diabetes, alcoholism, malnutrition, or chronic renal failure; or patients with advanced age). For patients with peripheral neuropathy, experts recommend increasing pyridoxine dose to 100 mg/day.

Terapia forme resistenti ai farmaci di prima linea

In figura 19, sono riportati i farmaci di II linea in base alle indicazioni WHO. I regimi di combinazione sono stabiliti in base alle caratteristiche della malattia tubercolare e in base ai test di sensibilità [50].

Resistenza a Isoniazide

Nel caso di monoresistenza a isoniazide con sensibilità dimostrata a RIF, il trattamento si basa sull'associazione di RIF, EMB, PZA e fluorochinolone.

MDR/RR

Nelle linee guida 2020 del WHO, una novità è rappresentata dalla possibile indicazione a un trattamento breve (9-12 mesi) nei casi che non abbiamo ricevuto in precedenza farmaci di II linea per più di un mese e per i quali sia stata esclusa la resistenza ai fluorochinoloni. In questi casi selezionati viene proposto un regime di combinazione con bedaquilina (6 mesi), levofloxacina/moxifloxacina, etionamide, etambutolo, isoniazide ad alte dosi, pirazinamide e clofazimina per 4 mesi (fino a 6 in caso di persistenza di escreato positivo), seguiti da 5 mesi di levofloxacina/moxifloxacina, etambutolo, pirazinamide e clofazimina. Questo regime non risulta indicato in caso di tubercolosi estesa (lesioni cavitari bilaterali o danno parenchimale esteso) o nel caso di forme gravi extrapolmonari (TB miliare o meningea).

Nel caso di necessità di regimi prolungati, è necessario associare i tre farmaci di gruppo A e almeno uno di gruppo B per garantire un regime con almeno 4 farmaci attivi, per poi proseguire con 3 farmaci attivi al momento dell'interruzione di bedaquilina. Nel caso sia possibile utilizzare uno o due dei farmaci A, sarà necessario includere entrambi i farmaci B. Se non possibile completare regime con farmaci A e B, sarà necessario utilizzare farmaci del gruppo C.

In alcuni casi può essere necessario associare 5 farmaci, ad esempio in caso di probabile tossicità (come nel caso di linezolid) che non porterebbe a proseguire 3 farmaci dopo la sospensione di bedaquilina, o nel caso di indisponibilità dei test di suscettibilità per alcuni dei farmaci utilizzati o nel caso di utilizzo di farmaci di scarsa efficacia (regimi con solo due farmaci di gruppo A e B).

In base alla risposta del paziente, il trattamento avrà una durata variabile di 18-20 mesi (in alcuni casi 15-17 mesi dopo la negativizzazione dei colturali)

Un recente studio ha dimostrato che l'associazione di bedaquilina, pretomanid e linezolid (BPaL) per 6-9 mesi sia associata a un *outcome* favorevole 6 mesi dopo il termine del trattamento, anche se con effetti collaterali in termini di neurotossicità e mielotossicità, associati a linezolid, rispettivamente dell'81% e del 48%. Al momento le linee guida WHO ne indicano l'utilizzo all'interno di studi osservazionali e previo consenso informato da parte del paziente. Al momento in corso uno studio sull'utilizzo del medesimo regime ma con dosi ridotte di linezolid, che, ha parità di efficacia, risulta associato a una riduzione delle tossicità associate [50]–[52].

Figura 19: classificazione dei farmaci utilizzabili nei regimi MDR/RR [50]

Groups and steps	Medicine	Abbreviation
Group A: Include all three medicines	Levofloxacin <i>or</i> moxifloxacin	Lfx Mfx
	Bedaquiline ^{b,c}	Bdq
	Linezolid ^d	Lzd
Group B: Add one or both medicines	Clofazimine	Cfz
	Cycloserine <i>or</i> terizidone	Cs Trd
	Ethambutol	E
	Delamanid ^e	Dlm
	Pyrazinamide ^f	Z
Group C: Add to complete the regimen and when medicines from Groups A and B cannot be used	Imipenem–cilastatin <i>or</i> meropenem ^g	Ipm–Cln Mpm
	Amikacin (<i>or</i> streptomycin) ^h	Am (S)
	Ethionamide <i>or</i> prothionamide ⁱ	Eto Pto
	<i>P</i> -aminosalicylic acid ^j	PAS

Infezione tubercolare latente

L'infezione tubercolare latente (LTBI, *Latent Tuberculosis Infection*) è una condizione in cui il soggetto è stato infettato da *M. tuberculosis* complex, ma in assenza di malattia tubercolare in atto [53]. L'infezione può essere dimostrata tramite test cutaneo tubercolinico (TST) o tramite un *interferon-gamma release assays* test (IGRA) [54]. Il test cutaneo tubercolinico (intradermoreazione di Mantoux) è eseguito tramite l'iniezione intradermica di 0,1 ml di PPD (*Purified Protein Derivative*, derivati proteici della tubercolina) nella faccia volare dell'avambraccio. La reazione cutanea dovrebbe essere letta dopo 48-72 ore dall'esecuzione del test, attraverso la misurazione in millimetri del diametro dell'infiltrato cutaneo formatosi. In base alla classe di rischio, la misura dell'infiltrato determina la definizione di LTBI. Il test IGRA misura la quantità di IFN- γ prodotto dai linfociti ematici dopo stimolazione con antigeni specifici di *M. tuberculosis* e presenta dei vantaggi rispetto a TST, ad esempio mancanza di cross-reattività nei confronti del Bacillo Calmette Guerin (BCG), errore di misurazione dell'infiltrato, non necessità di accedere al servizio dopo 72h, riducendo il *bias* dato dalla mancata *compliance* del soggetto; in base alle caratteristiche del soggetto i due test possono essere utilizzati in modo esclusivo o combinato o sequenziale [54].

Tubercolosi e migranti

I migranti hanno un aumentato rischio di infezione tubercolare, di malattia tubercolare e di peggior *outcome*, a causa di fattori di rischio, quali le condizioni di vita e lavorative, stato legale, scarso accesso ai servizi, discriminazione e percezione della tubercolosi come stigma, che ritardano l'accesso al Servizio Sanitario [55], [56]. Inoltre, la conoscenza limitata relativa ai sintomi della TB, alla trasmissione e al trattamento può ritardare l'accesso a servizi specializzati [57]. Nei Paesi con bassa incidenza di TB, lo stigma è enfatizzato dalla falsa percezione che i migranti siano responsabili di un aumento del rischio di trasmissione della TB nelle comunità ospitanti [58].

In studi precedenti, la comunità di migranti originari del Perù è emersa come gruppo vulnerabile, che può beneficiare di interventi mirati e di un'attività di controllo della TB [11], [57]. Comprendere la trasmissione nella comunità può migliorare le strategie preventive, come diagnosi precoce dei casi di tubercolosi attiva e valutazione dei contatti.

Contact tracing

Il termine *contact tracing* indica l'azione svolta dagli organismi sanitari competenti (in Italia dal Dipartimento di Igiene e Sanità Pubblica) per identificare i soggetti che potrebbero essere entrati in contatto con un caso di TB, valutando il loro rischio di esposizione e valutando sia la presenza di ulteriori casi di TB attiva sia soggetti che potrebbero beneficiare di azione preventive, quali la terapia per l'infezione tubercolare latente [54]. La probabilità di trasmissione dell'infezione dipende da una serie di fattori di rischio, legati alle caratteristiche cliniche del caso indice e alla tipologia di esposizione (vedi figura 20): ad esempio forme di TB polmonari o laringee, forme cavitari e bacillifere o la presenza di sintomatologia respiratoria incrementano la probabilità di contagio [60], [61]. Le linee guida dei *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) individuano come prioritario l'inizio di un'indagine epidemiologica in caso di forme polmonari o laringee, nel caso di un esame batterioscopico positivo per bacilli alcol-acido resistenti, in presenza di lesioni polmonari cavitari e comunque in tutti i casi il sospetto di una forma contagiosa di TB sia sospettata (fig 21) [61]. Un esempio di classificazione del rischio di contagio in base alle caratteristiche del caso indice è riportato in figura 22. Fondamentale è anche determinare il periodo infettivo del caso per procedere con la valutazione dei contatti e anche in questo caso fondamentale è conoscere le caratteristiche cliniche del caso stesso (fig 23).

Secondo le linee guida americane, il periodo di contagiosità è da definirsi concluso in presenza di tre criteri:

1. Trattamento efficace (in base ai test di sensibilità ai farmaci) intrapreso da più di 2 settimane
2. Miglioramento dei sintomi
3. Risposta microbiologica (ad esempio, riduzione del grado di positività all'esame microscopico)

Possono essere applicati criteri più stringenti nel caso in cui si sia in presenza di contatti particolarmente suscettibili, richiedendo l'ottenimento di 3 microscopici negativi da tre escreti consecutivi (almeno uno della mattina), raccolti a distanza di almeno 8 ore, prima di definire un caso non più contagioso [61].

Il *contact tracing* è un momento estremamente cruciale per il contenimento della TB in quanto permette di individuare sia eventuali nuovi casi sia di adottare opere di prevenzione attraverso l'identificazione di casi di infezione tubercolare latente e di soggetti a rischio. Si articola in diverse fasi:

- Raccolta di informazioni relative al caso indice: caratteristiche cliniche, esordio dei sintomi, inizio del trattamento, esami microbiologici comprensivi del test di suscettibilità farmacologica non appena disponibile, dati demografici (età, residenza, impiego, nazionalità, recapiti telefonici o mail), comorbidità
- Intervista al caso indice: per una corretta indagine epidemiologica è necessario adottare vari accorgimenti per superare eventuali reticenze, barriere culturali, paure correlate alla patologia in modo da ottenere idonee informazioni per individuare i contatti. E' necessario pertanto ottenere la fiducia del caso rispettando la sua *privacy*, concedendo del tempo per l'intervista e per spiegare gli obiettivi della stessa. Le domande dovranno cercare di ottenere informazioni relative ai luoghi frequentati, in particolare luoghi di aggregazione, e il tempo trascorso in essi. Durante l'intervista, sarà necessario ottenere la lista dei contatti con indicazione dei loro recapiti, del tempo trascorso con loro, in modo da poter classificare il livello di rischio di contagio. Sarà necessario ribadire la riservatezza dei dati forniti durante l'intervista e gli scopi per cui i dati saranno utilizzati.
- Generalmente sono necessari incontri successivi, durante i quali si cercherà di ottenere informazioni aggiuntive e nel caso di reticenza, può essere utile visitare i potenziali luoghi di aggregazione in modo da ottenere dati aggiuntivi [54], [61]
- Classificazione dei contatti in base alle caratteristiche del caso indice e del rischio di progressione del contatto dopo l'eventuale infezione tubercolare (in particolare soggetti

immunodepressi o di età inferiore ai 5 anni), ricordando che la probabilità di infezione dipende dall'intensità, dalla frequenza e dalla durata dell'esposizione (fig. 24)

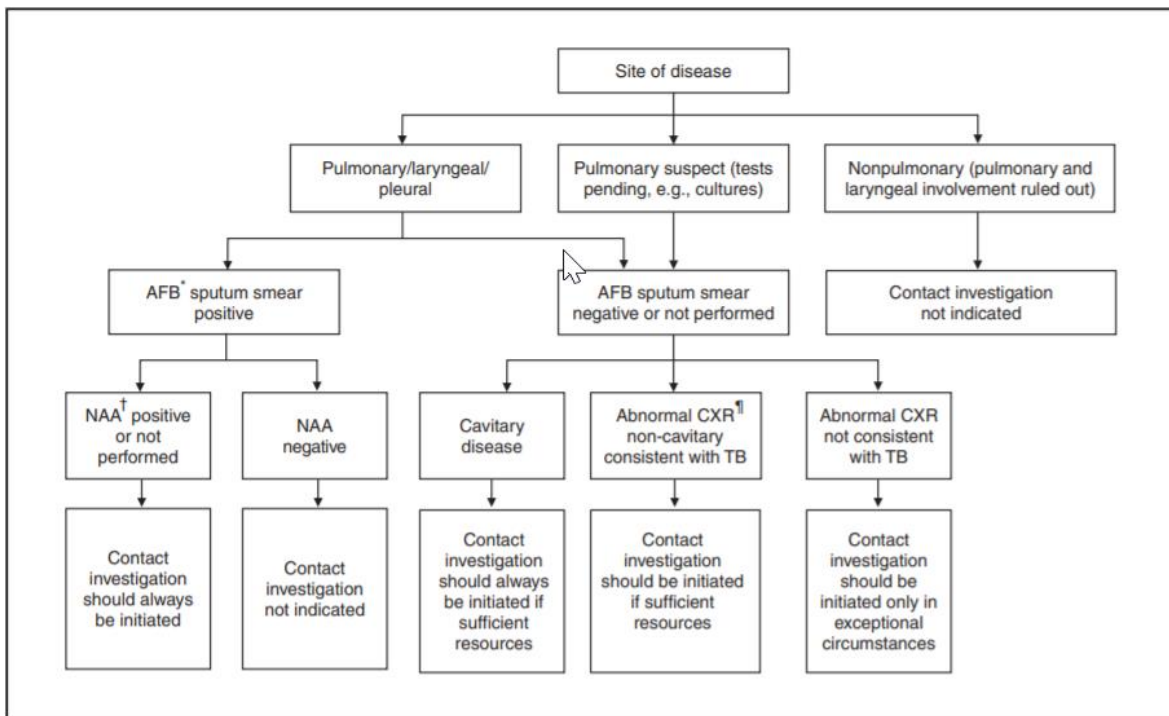
Il tradizionale contact tracing può presentare dei limiti in particolari *setting* e in gruppi a rischio, dove la percezione dello stigma o retaggi culturali possono ostacolare l'indagine epidemiologica. Negli ultimi anni, l'utilizzo di metodi non tradizionali ha permesso di comprendere meglio la trasmissione della TB e mettere in luce la presenza di *cluster* prima non identificati. In particolare, il contemporaneo utilizzo dei dati epidemiologici e di tecniche di genotipizzazione ha portato a evidenziare l'importanza dei contatti non familiari e la presenza di *cluster* non noti [62], [63]. Lo studio del *social network* inteso come la relazione esistente tra soggetti e luoghi all'interno di una struttura sociale, permette di evidenziare potenziali interazioni che possono rappresentare occasione di contagio, normalmente non evidenziate nella tradizionale indagine epidemiologica, ma che può essere alla base per un miglior controllo della TB [64].

Figura 20: fattori che influenzano il rischio di trasmissione di TB [60]

Clinical Characteristics	Source Case Activities	Exposure Circumstances
<ul style="list-style-type: none"> Respiratory or laryngeal TB disease Positive AFB sputum smears or cultures Cavitation on chest x-ray Adolescent or adult case Lack of TB treatment, ineffective TB treatment, or non-adherence to TB treatment 	<ul style="list-style-type: none"> Frequent coughing, sneezing, or other activities involving forceful expiration (e.g., singing, playing wind instruments) Cough inducing procedures or activities 	<ul style="list-style-type: none"> Significant duration of exposure (eg. more than 8 hours/week) Close physical proximity to case during exposure (eg. sleeping in the same room) Exposure in small or crowded and/or inadequately ventilated areas (eg. lack of windows) Contacts without adequate personal respiratory protection (e.g., health care providers donning surgical masks instead of N-95 particulate respirators)

* Cases with drug-resistant TB disease are not typically more infectious than cases with fully drug-susceptible TB disease. However, delays can occur in rendering infectious cases non-infectious, which can lead to ongoing transmission if effective infection prevention and control measures are not maintained.

Figura 21: Flowchart per decidere di intraprendere un'indagine epidemiologica [61]



* Acid-fast bacilli.
 † Nucleic acid assay.
 § According to CDC guidelines.
 ‡ Chest radiograph.

Figura 22: Esempio di stima di grado di contagiosità in base alle caratteristiche del caso indice [60]

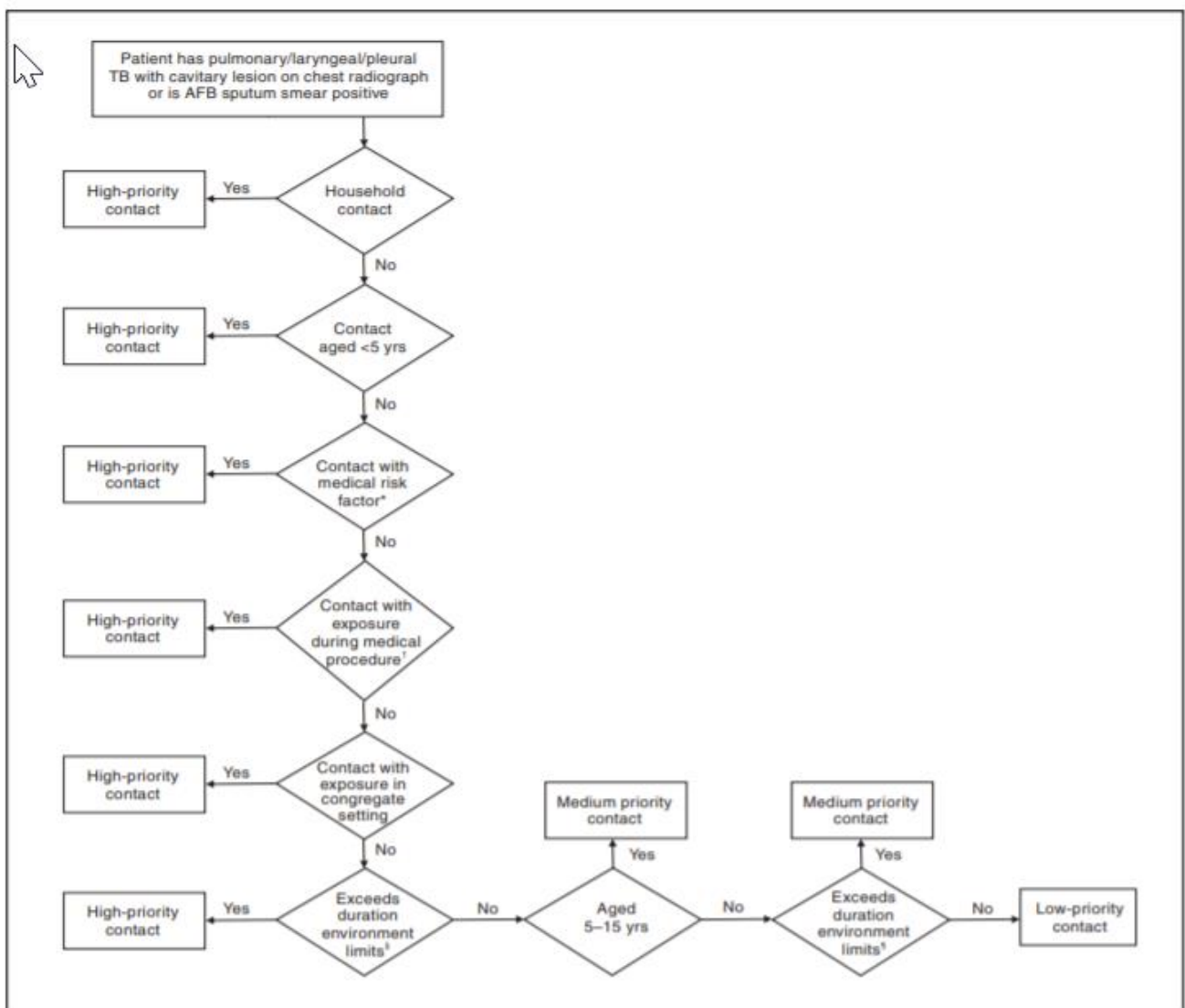
High Level of Infectiousness	Medium Level of Infectiousness	Likely Low Level of Infectiousness
Presence of cough AND Laryngeal TB disease OR Cavitary pulmonary TB disease on chest x-ray OR AFB smear-positive respiratory specimens*, regardless of Gaffky count	Presence of cough AND Non-cavitary pulmonary TB disease on chest x-ray AND AFB smear-negative / culture-positive respiratory specimens*	No cough AND Concomitant respiratory TB disease ruled out OR Respiratory TB disease with AFB smear- and culture-negative respiratory specimens* (i.e. "clinical case") OR Patient has received and is tolerating adequate treatment** for 2 weeks or longer and respiratory specimens* have become (or continue to be) AFB smear-negative

* This could include spontaneous or induced sputum, bronchial washings, tracheostomy and endotracheal aspirates, or gastric washings/aspirates in the case of pediatric clients.
 ** As evidenced by drug susceptibility testing, adherence, and clinical and radiographic response to treatment.

Figura 23: indicazioni per la stima dell'inizio del periodo di contagiosità in base alle caratteristiche del caso indice [61]

TB symptoms	Characteristic		Recommended minimum beginning of likely period of infectiousness
	AFB ⁺ sputum smear positive	Cavitary chest radiograph	
Yes	No	No	3 months before symptom onset or first positive finding (e.g., abnormal chest radiograph) consistent with TB disease, whichever is longer
Yes	Yes	Yes	3 months before symptom onset or first positive finding consistent with TB disease, whichever is longer
No	No	No	4 weeks before date of suspected diagnosis
No	Yes	Yes	3 months before first positive finding consistent with TB

Figura 24: Classificazione dei contatti esposti a TB bacillifera o cavitaria [61]



* Human immunodeficiency virus or other medical risk factor.

† Bronchoscopy, sputum induction, or autopsy.

‡ Exposure exceeds duration/environment limits per unit time established by the health department for high-priority contacts.

‡ Exposure exceeds duration/environment limits per unit time established by the health department for medium-priority contacts.

Obiettivi dello studio

Nel nostro studio, proponiamo l'uso di WGS nei nuovi casi di TB confermati per comprendere la trasmissione nell'area fiorentina e in particolare nella comunità peruviana.

Obiettivi specifici dello studio

- Comprendere le dinamiche della trasmissione della TB
- Creare una mappa di distribuzione di nuovi casi
- Utilizzare l'analisi di WGS, per identificare cluster, riattivazioni e trasmissione recente, ai fini della comprensione delle dinamiche della trasmissione della tubercolosi nell'ASL di Firenze
- Riconsiderare le strategie di prevenzione per migliorare il controllo della TB sulla base dei dati ottenuti
- Utilizzare i dati acquisiti sulla dinamica di trasmissione della TB nella comunità peruviana per promuovere l'accesso a servizi specializzati e ridurre il ritardo nella diagnosi e nel trattamento
- Contribuire con le conoscenze acquisite allo sviluppo di campagne di informazione, educazione e comunicazione sul rischio di tubercolosi nella popolazione migrante
- Contribuire alla riduzione dello stigma legato a questa malattia soprattutto nella popolazione migrante

Disegno dello studio

Studio osservazionale retro-prospettico, multicentrico, nazionale, con arruolamento di casi di TB accertata da gennaio 2018 a settembre 2020. I pazienti arruolati sono soggetti affetti da TB confermata, in carico alla SOD Malattie Infettive e Tropicali dell'AOUC e alle Malattie Infettive, dell'Ospedale Santa Maria Annunziata, Azienda USL Toscana Centro.

Criteri di inclusione

- Diagnosi confermata di tubercolosi con coltura positiva per *M. tuberculosis* complex
- Età \geq 18 anni
- Consenso informato e datato alla partecipazione allo studio

Dati raccolti

Per ogni paziente arruolato, sono stati raccolti i seguenti dati:

- informazioni demografiche (sesso, data di nascita, nazionalità, se stranieri, anno di arrivo in Italia)
- risultati degli esami microbiologici relativi alla diagnosi di tubercolosi (risultato esame microscopico, risultato PCR per *M. tuberculosis* complex, esame colturale, test di sensibilità)

- esami radiologici

In collaborazione con il Dipartimento di Prevenzione della Asl di Firenze, sono state inoltre raccolte le informazioni relative all'indagine epidemiologica eseguita in seguito alla segnalazione del caso, con l'obiettivo di realizzare una mappa di distribuzione di casi: dalle schede delle indagini epidemiologiche sono pertanto stati ricavati dati relativi all'individuazione di *cluster* (nuovi casi di TB, casi già noti di TB).

Analisi microbiologiche

L'analisi microbiologica, compresi i test di sensibilità antimicrobica, è stata eseguita dal Laboratorio di Micobatteriologia, SOD Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi. Il WGS è stato eseguito presso l'*Emerging Bacterial Pathogen (EBP) Unit, Division of Immunology, Transplantation and Infectious Diseases*, IRCCS Ospedale San Raffaele Milano.

Di ciascun paziente con diagnosi di tubercolosi e coltura positiva è stato trasferito 1 mL di brodo di coltura MGIT in una microvial. Tale microvial, contrassegnata da un numero identificativo, anonimizzata, è stata inattivata per 30 min a 95°C (uccidendo microrganismi contenuti) e fatta pervenire alla Unità EBP dell'Ospedale San Raffaele di Milano.

Nel laboratorio di Milano il contenuto della provetta è stato utilizzato per creare una library (amplificazione del DNA), successivamente sequenziata con la piattaforma Illumina. Le read prodotte dal sequenziatore sono state analizzate con la pipeline bioinformatica MTBseq che provvede ad allinearle al genoma di *M. tuberculosis* H37Rv per identificare sia eventuali SNP filogenetici, che permettono di collocare il ceppo in uno dei lineage di *M. tuberculosis*, sia eventuali SNP responsabili di resistenza, consentendo di individuare resistenze a farmaci sia di prima sia di seconda linea. Le *read* vengono poi analizzate con il software SeqSphere per creare un albero filogenetico dei vari ceppi sequenziati in base agli SNP di differenza rilevati. Tale albero filogenetico permette di tracciare le trasmissioni dell'infezione fra pazienti.

Il Laboratorio dell'Unità EBP dell'Ospedale San Raffaele di Milano ha trasmesso i seguenti dati:

- N. identificativo del paziente
- Qualità del sequenziamento ottenuto
- Conferma dell'identificazione come *M. tuberculosis*
- *Lineage* a cui appartiene il ceppo
- *Pattern* completo di resistenze genotipiche
- Indicazione di ceppi sequenziati in precedenza coinvolti nello stesso *cluster* epidemico

Per la definizione di *cluster*, è stato utilizzato sia il limite di 5 SNP come probabile per una trasmissione diretta[65], sia il *cut-off* di 12 SNP (limite massimo)[66], [67].

Approvazione del Comitato Etico

Lo studio è stato sottomesso al Comitato Etico Locale, ottenendo approvazione (17315/OSS) e successiva autorizzazione da parte del Direttore Generale dell’Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi.

Analisi statistica

Per l’analisi statistica è stato utilizzato il programma di elaborazione dati STATA (versione 14.0, StataCorp, College Station, Texas). Abbiamo usato statistiche descrittive come le mediane, con i relativi intervalli interquartili IQR, per descrivere variabili continue, e proporzioni per le variabili categoriche. Test parametrici (*chi quadro*, *Fisher exact test*) e non parametrici (Mann-Whitney) sono stati utilizzati dove indicato.

Risultati

Nel periodo gennaio 2018-settembre 2020, sono stati arruolati 106 nuovi casi di TB presso la SOD Malattie Infettive e Tropicali dell’AOUC e 58 presso le Malattie Infettive dell’Ospedale di Santa Maria Annunziata, Firenze, per un totale di 164 nuovi casi di TB. Tale popolazione è rappresentata da 105 pazienti di sesso maschile (64%) e l’età media è di 44 anni (DS \pm 21 anni). In tabella 1, sono riportate le caratteristiche demografiche e cliniche principali della popolazione in studio. Il 37.8% dei pazienti (62) erano affetti da altre patologie, in particolare da diabete (15 pazienti). La forma di TB più diffusa è quella a localizzazione polmonare con il 12.2% dei casi di forma extrapolmonare, nella maggioranza dei casi linfonodale. Nell’86% dei casi si è ottenuto la guarigione del soggetto, mentre nel 6.7% il paziente è stato perso al successivo *follow up* per mancata aderenza alle visite programmate o per trasferimento presso altra sede. Dieci (90.9%) dei pazienti persi al *follow up* erano di nazionalità straniera, di cui 3 (27.3%) di nazionalità peruviana.

Tabella 1: Caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione in studio

Popolazione	164
Maschi (N, %)	105, 64%
Età (media, DS)	44, 21
Cittadinanza estera (N;%)	118, 71.9
Anni di residenza in Italia (media, DS)	8, 8
Comorbidità (N, %)	62, 37.8
<i>Diabete</i>	15
<i>Pregressa patologia neoplastica</i>	4
<i>BPCO</i>	3
<i>Terapia immunosoppressiva</i>	3
<i>Coinfezione HIV</i>	3
Tubercolosi polmonare	135 (82.3%)
<i>Bacillifera</i>	98
<i>Non bacillifera</i>	35
Tubercolosi extrapolmonare	20 (12.2%)
<i>Linfonodale</i>	11
<i>Addominale</i>	4
<i>Ossea</i>	3
<i>Linfonodale e ossea</i>	1
<i>Cerebrale</i>	1
Tubercolosi miliare	9 (5.5%)
Esito del trattamento	
<i>Guarito</i>	141, 86%
<i>Perso al follow up/trasferito</i>	11, 6.7%
<i>Deceduto</i>	12, 7.3%

Nel grafico 1, è riportata la provenienza dei casi. Per quanto concerne i pazienti provenienti dal Sud America (n=29, 18%), 26 risultano originari del Perù. Nel grafico 2, è riportato il dettaglio dei pazienti non italiani: i pazienti di nazionalità peruviana rappresentano il 22% della popolazione straniera, costituita per la maggioranza da soggetti di origine asiatica (38 pazienti, 32% della popolazione straniera). I soggetti stranieri erano residenti in Italia, in media, da 8 anni (DS \pm 8 anni). In tabella 2, sono riportate le 10 principali nazionalità tra i pazienti con diagnosi di TB: i soggetti di nazionalità

peruviana rappresentano la popolazione straniera più numerosa tra le nuove diagnosi di TB (26, 22%).

Grafico 1: Provenienza dei nuovi casi di tubercolosi da gennaio 2018 a settembre 2020

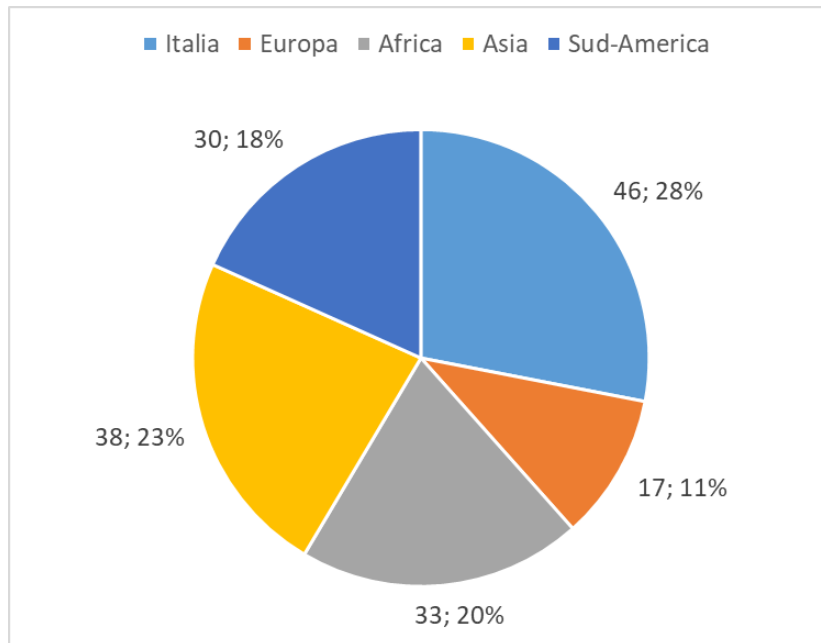


Grafico 2: Provenienza dei nuovi casi di tubercolosi non italiani

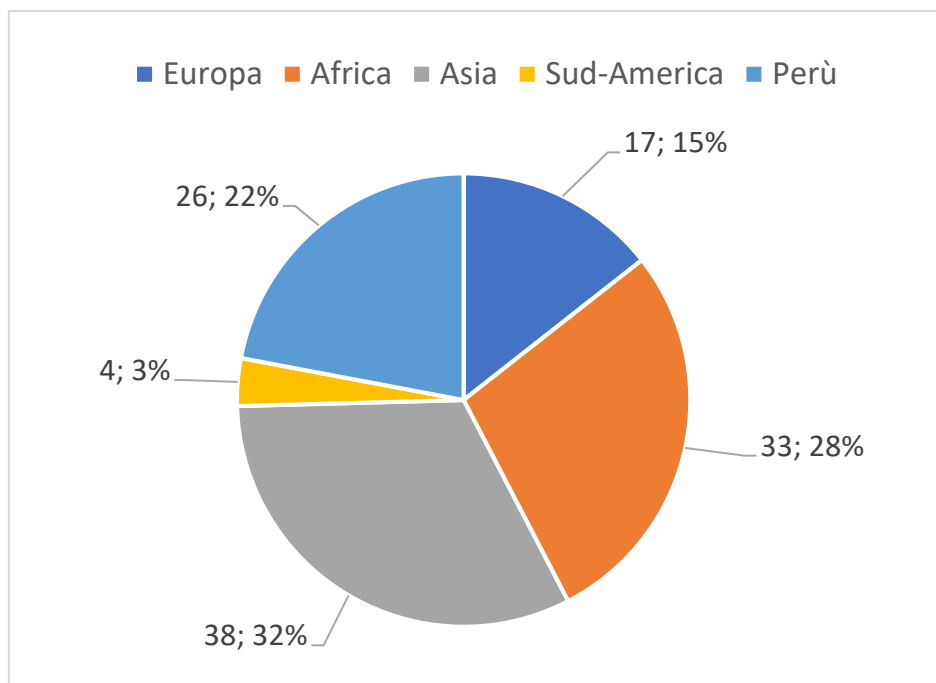


Tabella 2. 10 principali nazionalità dei pazienti con TB

Paese	numero
Perù	26
Pakistan	12
Senegal	12
Romania	10
Filippine	9
Cina	7
India	7
Albania	5
Guinea	4
Marocco	4

Quattro pazienti hanno ricevuto una diagnosi *ex juvantibus* (risposta clinica e radiologica al trattamento antitubercolare), per cui non è possibile avere dati sulla sensibilità farmacologica. Per i 160 pazienti con diagnosi confermata di TB, i test di sensibilità fenotipica hanno evidenziato 11 casi di monoresistenza ai farmaci di prima linea (7 a isoniazide, 4 a pirazinamide), 1 caso di resistenza combinata a isoniazide e pirazinamide, 1 caso di TB MDR.

L'analisi genotipica effettuata ha mostrato i dati presenti in tabella 3. Quattro monoresistenze fenotipiche a pirazinamide non sono state confermate dai test genotipici. Cinque ceppi totisensibili ai test fenotipici hanno invece mostrato mutazioni associate in 2 casi a streptomina, 2 a fluorochinoloni e uno a etambutolo.

A causa dell'emergenza legata alla pandemia da SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus-2), le attività del Dipartimento di Prevenzione della Asl 10 di Firenze si sono concentrate sul controllo e il contenimento della pandemia a livello locale, per cui le indagini epidemiologiche sono state effettuate su 105 casi (64% dei casi). In tali indagini sono stati individuati i *cluster* presenti in tabella 4, comprensivi anche di casi pediatrici, non facente parte della popolazione in studio. I soggetti coinvolti nei *cluster* erano 22, di cui 81.8% (18) di nazionalità straniera, in particolare di nazionalità peruviana il 27% (6 soggetti). Ulteriori *cluster* sono stati individuati attraverso l'indagine, andando a considerare casi precedenti o successivi al periodo dello studio (in tabella *cluster* 9-10).

Durante l'indagine epidemiologica sono stati individuati 232 soggetti con infezione tubercolare latente (ITL), in media 2 ITL per ogni caso di TB accertata, con 56 trattamenti per ITL prescritti.

Nel grafico 3 la percentuale di positivi tra i contatti individuati e la percentuale di trattati.

Tabella 3. Analisi genotipica e fenotipica

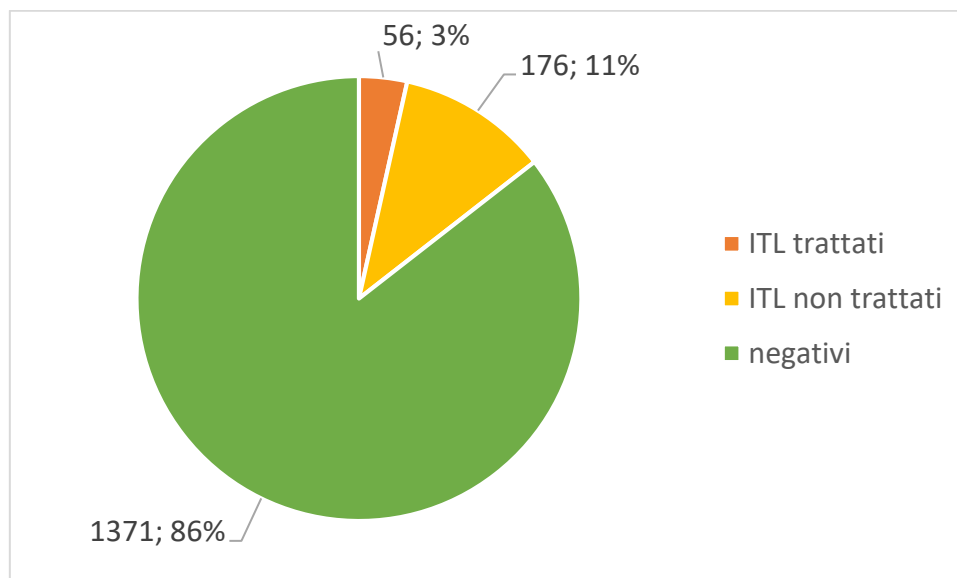
Ceppi	Resistenza fenotipica	Resistenza genotipica
C64-2018	INH-R	INH-R
C141-2019	INH-R	INH-R
C117-2019	MDR	MDR
C104-105-2019	TOTI-S	STM-R
C38-2018	INH PZN-R	INH-R
C32-2018	INH-R	INH-R
C24-2018	INH-R	INH-R
C22-2018	TOTI-S	FQ-R
C15-2018	INH-R	INH-R
C48-2018	INH-R	INH-R
C111-2019	TOTI-S	STM-R
C52-2019	INH-R	INH-R
C45-2019	TOTI-S	EMB-R
C16-2019	TOTI-S	FQ-R

Abbreviazioni: EMB-R= etambutolo resistente, FQ-R= fluorochinoloni resistente, INH-R= isoniazide resistente, STM-R= streptomicina resistente, MDR= multidrug resistance, TOTI-S= totisensibile

Tabella 4. Cluster individuati con indagine epidemiologica

Cluster	Size	ID paziente	Nazionalità 1	Nazionalità 2
1	2 contatti stretti	CAREGGI_BF_19, CAREGGI_CNA_19	Italiana	Italiana
2	2 contatti stretti	CAREGGI_CG_18, CAREGGI_CMBA_18	Italiana	Peruviana
3	2 conviventi	CAREGGI_CGe_18, MEYER_18	Rumena	Rumena
4	2 conviventi	OSMA_KM_19, OSMA_KN_19	Albanese	Albanese
5	3 contatti stretti	CAREGGI_KP_19, 2MEYER_19	Albanese	Albanese (2)
6	2 conviventi	OSMA_LHJL_19, CAREGGI_TGCM_19	Peruviana	Peruviana
7	2 conviventi	OSMA_SLDH_19, OSMA_DF_18	Peruviana	Italiana
8	3 conviventi	CAREGGI_TNAV_19, 2MEYER_19	Camerunense	Camerunense (2)
9	2 conviventi	CAREGGI_VZEM_19, CAREGGI2021_CAI	Peruviana	Peruviana
10	2 conviventi	CAREGGI_ZX_20, CAREGGI2021_JS	Cinese	Cinese

Grafico 3. Esito indagini epidemiologiche su contatti di casi TB (totale 1603)



Risultati WGS

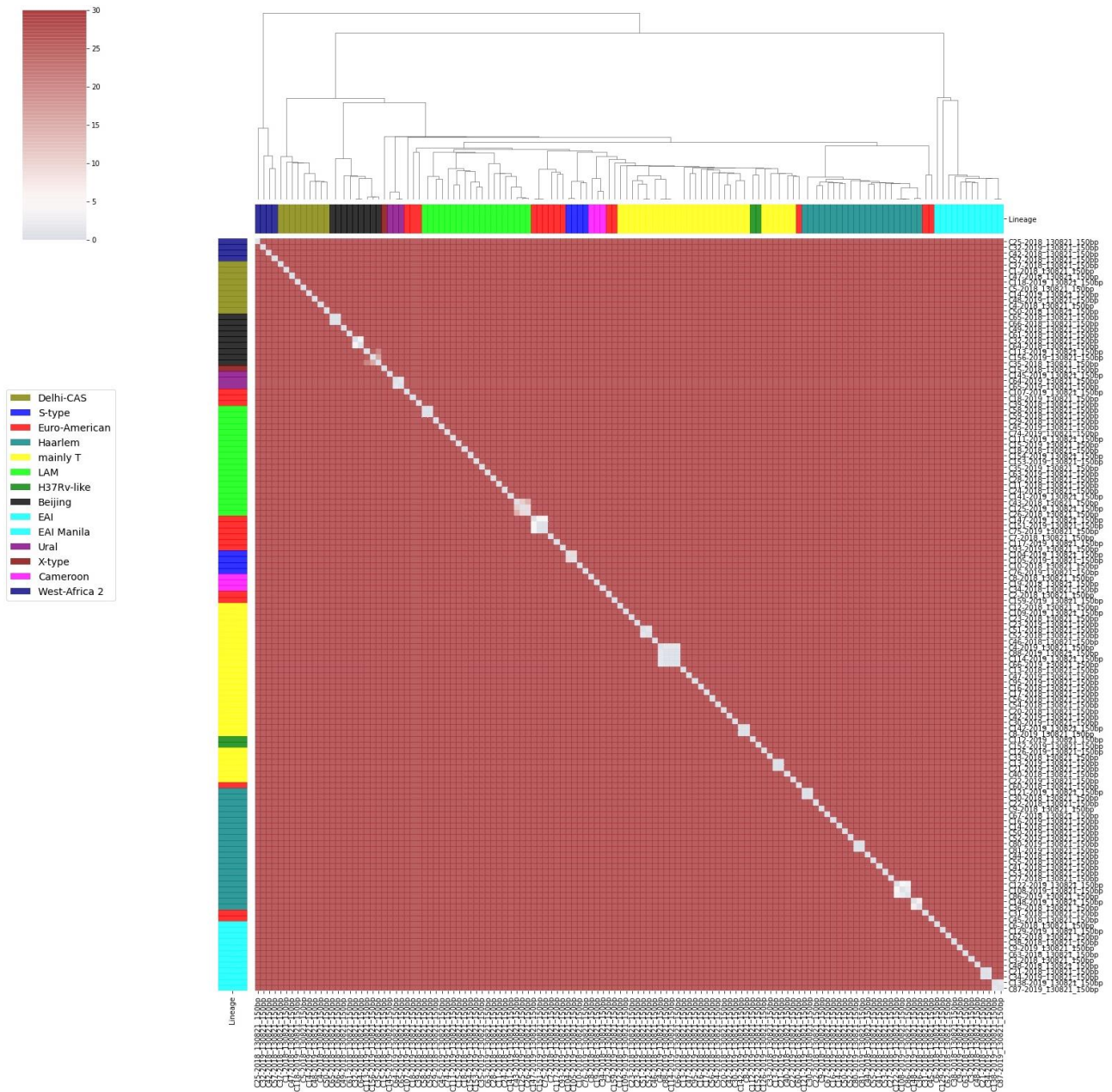
Per problematiche correlate alla pandemia SARS-CoV-2, nel rispetto delle norme vigenti per l'invio dei campioni e considerando la necessità di dedicare i laboratori alla diagnostica di SARS-CoV-2, è stato possibile analizzare presso l'EBP del San Raffaele 131 campioni, relativi a casi di TB diagnosticati nel periodo 2018-2019 (67 del 2018 e 64 del 2019). Dopo sequenziamento, due campioni risultavano non analizzabili, uno del 2018 per popolazione mista tubercolare e non tubercolare e uno del 2019 per contaminazione. In totale, pertanto, sono stati analizzati 129 campioni che presentavano una qualità sufficiente per l'analisi, relativi a 123 pazienti. In figura 25 è presentata la mappa dei *cluster*, fig 25-a basata su 5 SNP, in totale 14 *cluster* (4 relativi a campioni dello stesso paziente), e fig. 25-b su 12 SNP, in totale 17 *cluster* (4 relativi a campioni dello stesso paziente). In tabella 4, riportata la composizione dei *cluster*, rispettivamente in base a 5 SNP (4-a) e 12 SNP (4-b). Considerando 12 SNP, la percentuale di pazienti coinvolti in *cluster* è del 25% (31/123 pazienti), considerando invece 5 SNP, la percentuale è del 19.5% (24/123 pazienti). La composizione dei *cluster* per 12 SNP è di 1 *cluster* con 4 soggetti, 3 con 3 soggetti e 9 con 2 soggetti. Per 5 SNP, 1 *cluster* con 4 soggetti, 2 con 3 soggetti e 7 con 2 soggetti

In figura 26, Minimum Spanning Tree 12 SNP-based con la rappresentazione grafica dei *cluster*. In figura 27, ritroviamo invece la suddivisione in base ai *lineages* (130 individuati) e il grafico delle relative percentuali sulla popolazione analizzata: 22% mainly T, 16% Haarlem, 15% LAM.

In tabella 5, sono riportate le caratteristiche delle due popolazioni di soggetti in base a 5 SNP e 12 SNP. Nel caso di 5 SNP, 24 soggetti sono coinvolti in *cluster*, 99 non fanno parte di cluster noti; la diagnosi di forma bacillifera sembra essere associato significativamente ($p < 0.05$) all'essere coinvolti in cluster di trasmissione. Nel caso di 12 SNP, 31 soggetti vanno a costituire i *cluster* individuati tramite WGS e 92 non coinvolti nei *cluster* individuati. Le due popolazioni non presentano differenze significative per quanto riguarda caratteristiche demografiche e tipologia di TB (polmonare e bacillifera), non evidenziando pertanto fattori di rischio di trasmissione associati alle variabili considerate.

Figura 25. Cluster Map SNP-based. Il colore rappresenta il lineage

a- 5 SNP



b- 12 SNP

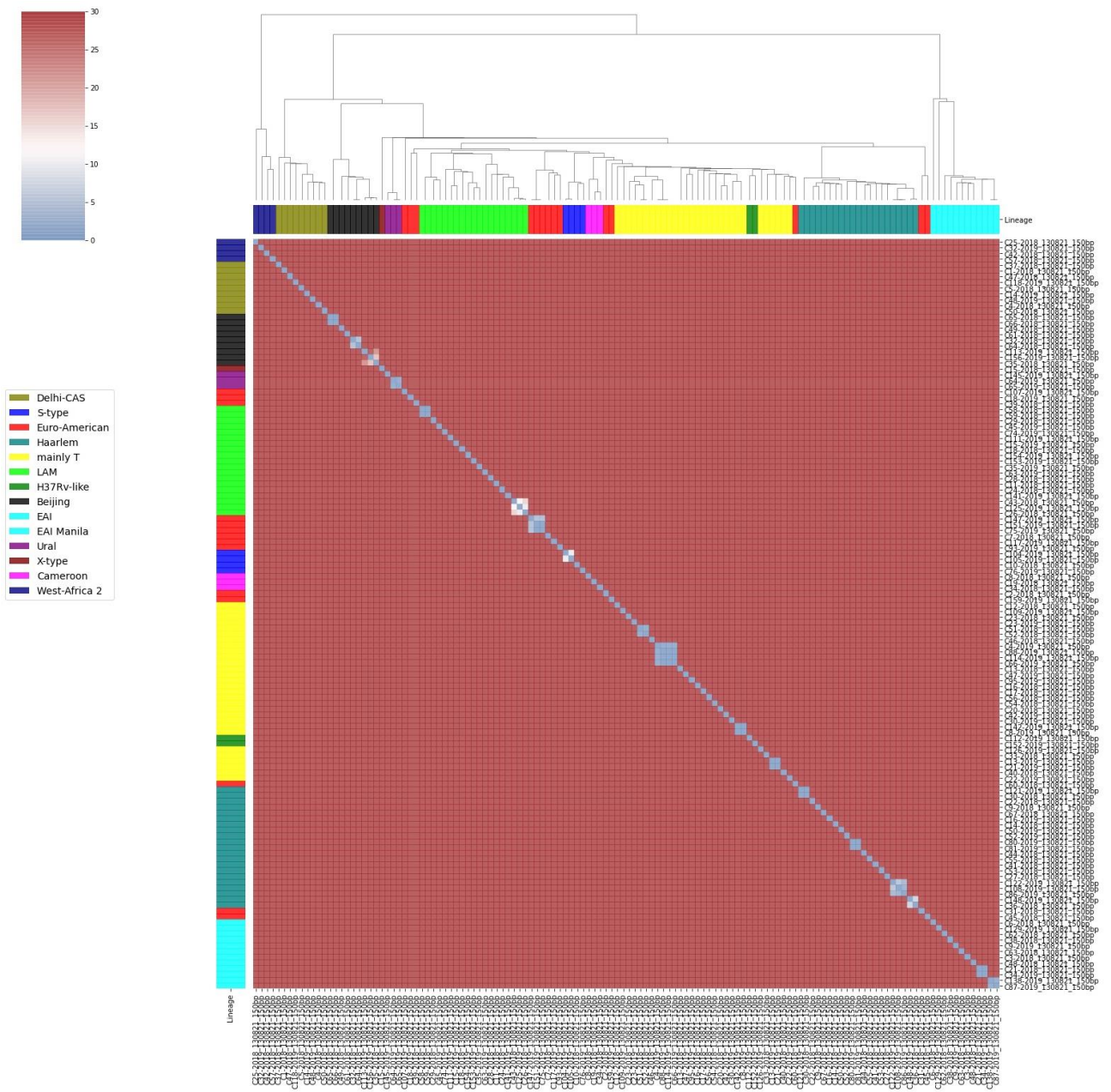


Tabella 4. Composizione dei *cluster* individuati in base a SNP

a- 5 SNP

Cluster	Size	ID1	ID2	ID3	ID4
92	3	C108-2019	C122-2019	C86-2019	
57	4	C114-2019	C4-2019	C66-2019	C88-2019
82	2	C121-2019	C30-2018		
71	2	C13-2019	C21-2019		
108	2	C138-2019	C87-2019		
63	2	C142-2019	C8-2019		
43	3	C147-2019	C151-2019	C75-2019	
107	2	C21-2018	C34-2019		
15	2	C32-2018	C64-2018		
54	2	C51-2018	C52-2018		
25	2	C58-2018	C59-2018		
21	2	C64-2019	C65-2019		
14	2	C65-2018	C66-2018		
89	2	C80-2019	C81-2019		

b- 12 SNP

Cluster	size	ID1	ID2	ID3	ID4
45	2	C104-2019	C105-2019		
89	3	C108-2019	C122-2019	C86-2019	
54	4	C114-2019	C4-2019	C66-2019	C88-2019
79	2	C121-2019	C30-2018		
35	3	C125-2019	C26-2018	C43-2018	
68	2	C13-2019	C21-2019		
104	2	C138-2019	C87-2019		
60	2	C142-2019	C8-2019		
41	3	C147-2019	C151-2019	C75-2019	
90	2	C148-2019	C36-2018		
103	2	C21-2018	C34-2019		
15	2	C32-2018	C64-2018		
51	2	C51-2018	C52-2018		
25	2	C58-2018	C59-2018		
21	2	C64-2019	C65-2019		
14	2	C65-2018	C66-2018		
86	2	C80-2019	C81-2019		

Figura 26. Minimun Spanning Tree 12 SNP-based

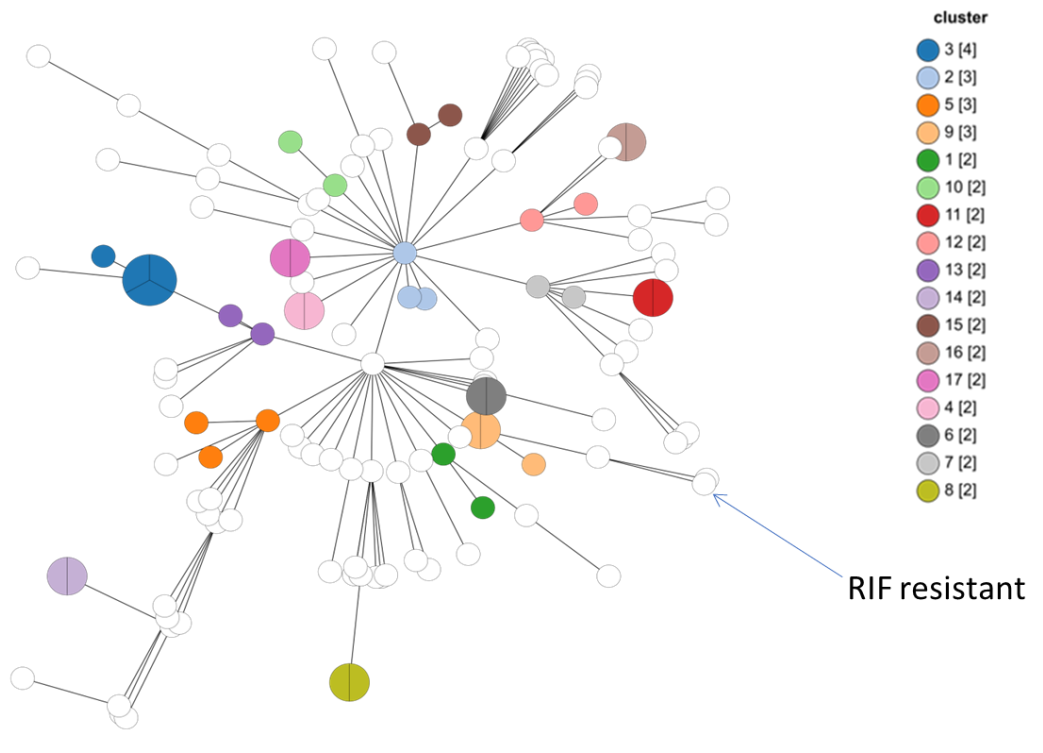


Figura 27. Minimum Spanning Tree SNP-based, Lineages

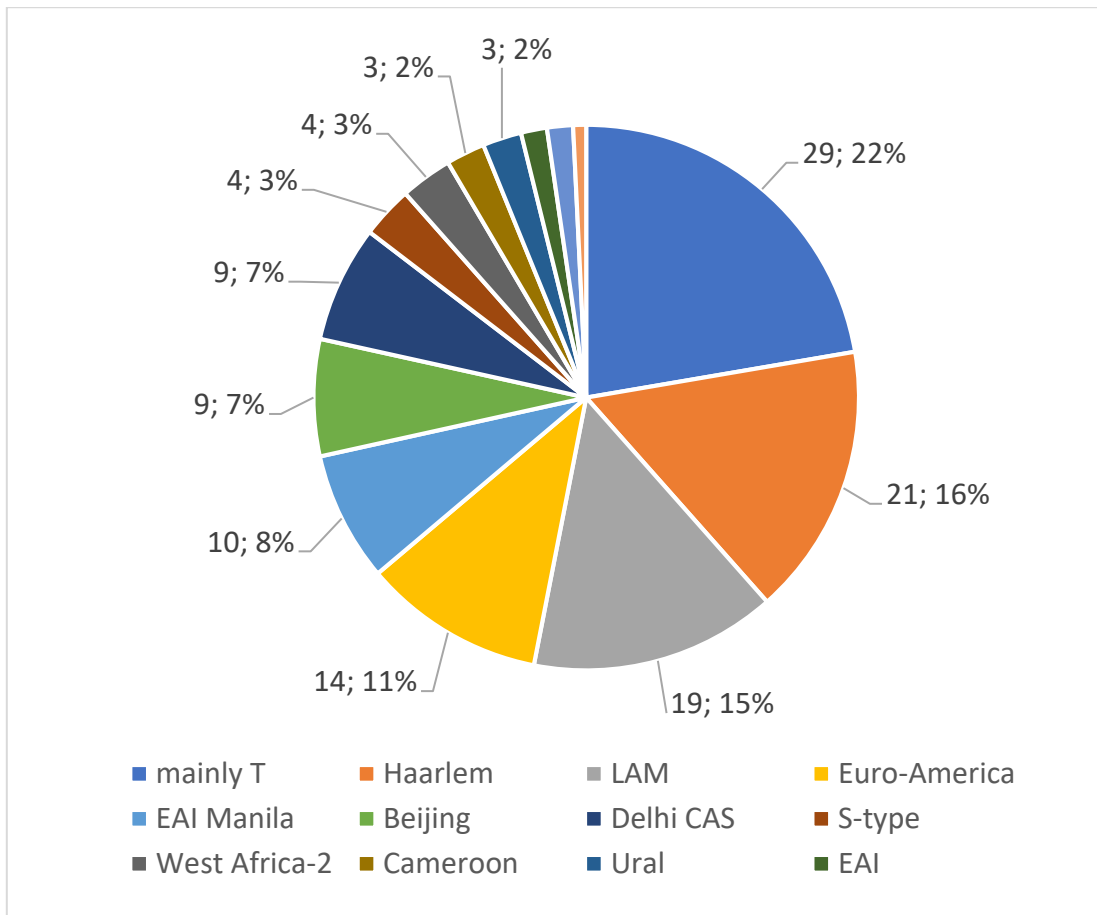
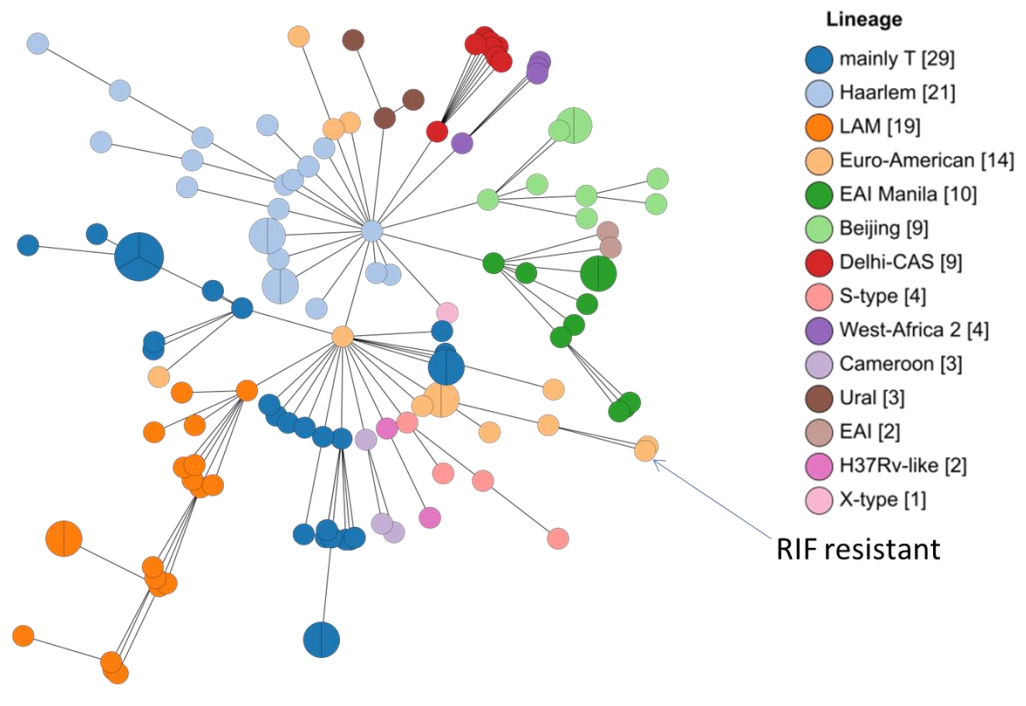


Tabella 5. Caratteristiche della popolazione sottoposta ad analisi WGS (totale 123 pazienti)

A- 5 SNP

	Pz coinvolti in <i>cluster</i> (24)	Pz non coinvolti in <i>cluster</i> (99)	<i>p-value</i>
Età media (media DS)	51, 18	46, 22	0.17
Maschi N (%)	12 (50)	65 (65.7)	0.15
Stranieri N (%)	15 (62.5)	70 (70.7)	0.43
Media anni arrivo in Italia	14	7	0.23
Pz con comorbidità N (%)	8 (33.3)	40 (40.4)	0.52
TB polmonare N (%)	24 (100)	85 (85.8)	-
TB bacillifera N (%)	13 (54.2)	74 (74.7)	0.05
Guarigione N (%)	20 (83.3)	84 (84.8)	0.92

B- 12 SNP

	Pz coinvolti in <i>cluster</i> (31)	Pz non coinvolti in <i>cluster</i> (92)	<i>p-value</i>
Età media (media DS)	47, 18	47, 22	0.41
Maschi N (%)	19 (61.3)	58 (63)	0.86
Stranieri N (%)	20 (64.5)	65 (70.6)	0.52
Media anni arrivo in Italia	10	8	0.23
Pz con comorbidità N (%)	11 (35.5)	38 (41.3)	0.57
TB polmonare N (%)	31 (100)	78 (84.8)	-
TB bacillifera N (%)	18 (58)	69 (75)	0.14
Guarigione N (%)	27 (87)	77 (83.7)	0.65

Integrazione tra dati epidemiologici e WGS

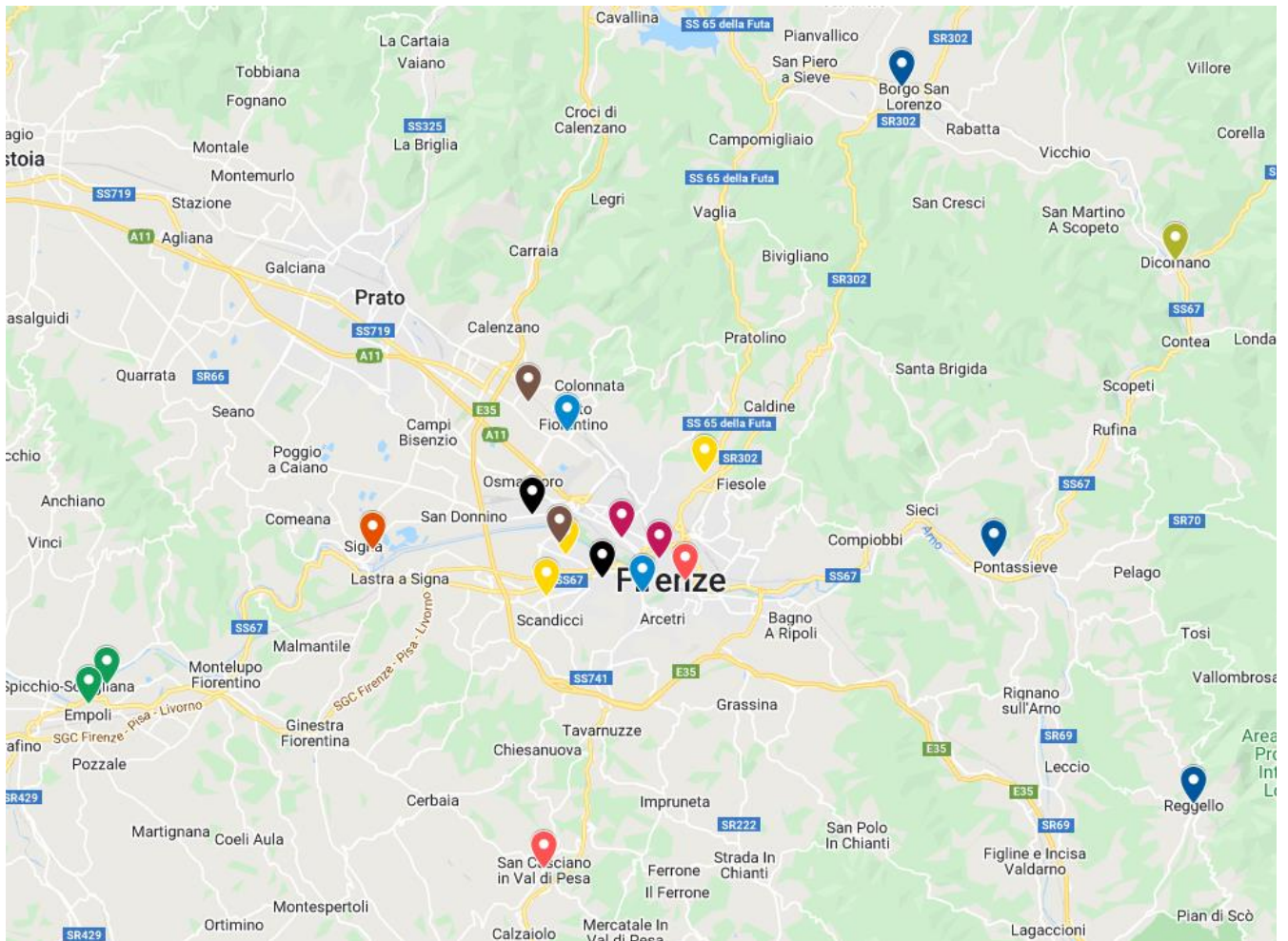
Incrociando i dati clinici ed epidemiologici con i dati WGS, si evince che in 4 casi si trattava di ceppi provenienti dallo stesso paziente con variazioni genotipiche minime. Considerando variazioni di 5 SNP, i soggetti coinvolti nei *cluster* sono 24, pari al 19.5% dei soggetti della popolazione esaminata, per un totale di 10 *cluster*. Secondo l'analisi in base a 12 SNP, i soggetti coinvolti nei *cluster* sono 31, pari al 25% dei soggetti della popolazione esaminata, per un totale di 13 *cluster*. Tre *cluster* erano composti da soggetti appartenenti allo stesso nucleo familiare/amicale, 1 *cluster* era composto da due soggetti dello stesso nucleo e 1 non noto. In 9 *cluster*, l'indagine epidemiologica non ha evidenziato la presenza di un contatto, né erano stati dichiarati reciprocamente come contatti extra-familiari; l'analisi delle schede relative all'indagine epidemiologica non ha permesso di individuare nessi epidemiologici di altro tipo o da collegare a un *network* comune. La loro distribuzione sul territorio è riportata in figura 28 a e b in base a SNP: dalla cartina si osserva come la maggior parte dei *cluster* non sia associata a una vicinanza di domicilio.

La nazionalità dei pazienti coinvolti nei *cluster* è riportata nel grafico 4: in base a 5 SNP, nel 37% si trattava di soggetti italiani, seguiti da soggetti di origine europea (4, 17%), asiatica (4, 17%) e soggetti di nazionalità peruviana (4, 17%); in base a 12 SNP, nel 36% si trattava di soggetti italiani, seguiti da soggetti di origine africana (5, 16%), asiatica (5, 16%) e soggetti di nazionalità peruviana (4, 13%). Sei *cluster* (12 SNP) erano composti da soggetti della stessa nazionalità (46%).

In Tabella 6, la rielaborazione dei *cluster* individuati in base a 5 SNP (tabella 6-a) 12 SNP (tabella 6-b) e a dati epidemiologici. I *cluster* composti da conviventi erano noti all'indagine epidemiologica.

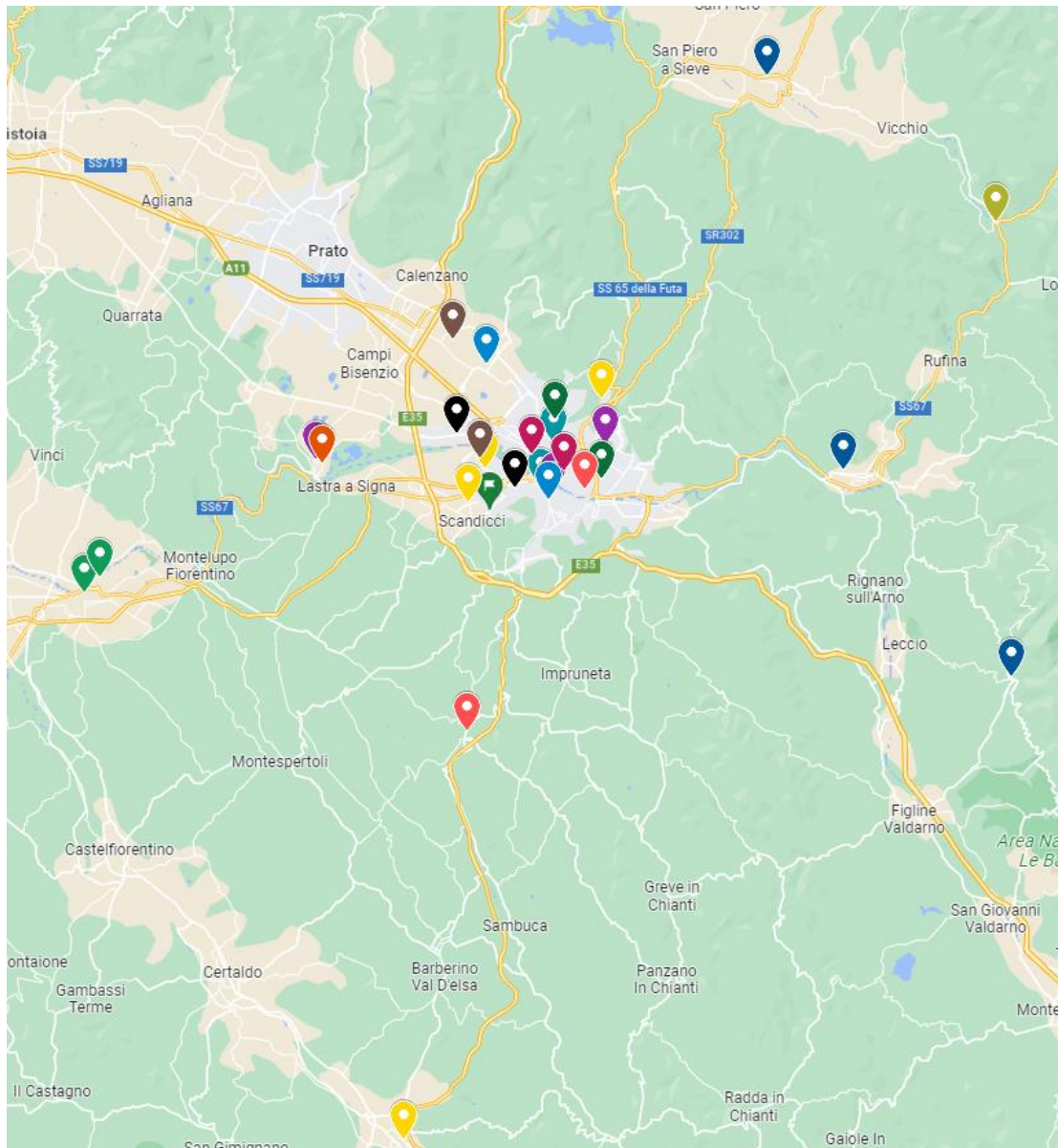
Figura 28. Distribuzione dei cluster sull'Area fiorentina

a- 5 SNP



- | | | |
|------------|----------------------|--------------------|
| C-108-2019 | C-121-2019;C-30-2018 | C-64-2018 |
| C-122-2019 | C-87-2019 | C-32-2018 |
| C-86-2019 | C-138-2019 | C-51-2018 |
| C-88-2019 | C-142-2019 | C-52-2018 |
| C-66-2019 | C-8-2019 | C13-2019 |
| C-4-2019 | C-151-2019 | C21-2019 |
| C-114-2019 | C-75-2019 C147-2019 | C64-2019; C65-2019 |

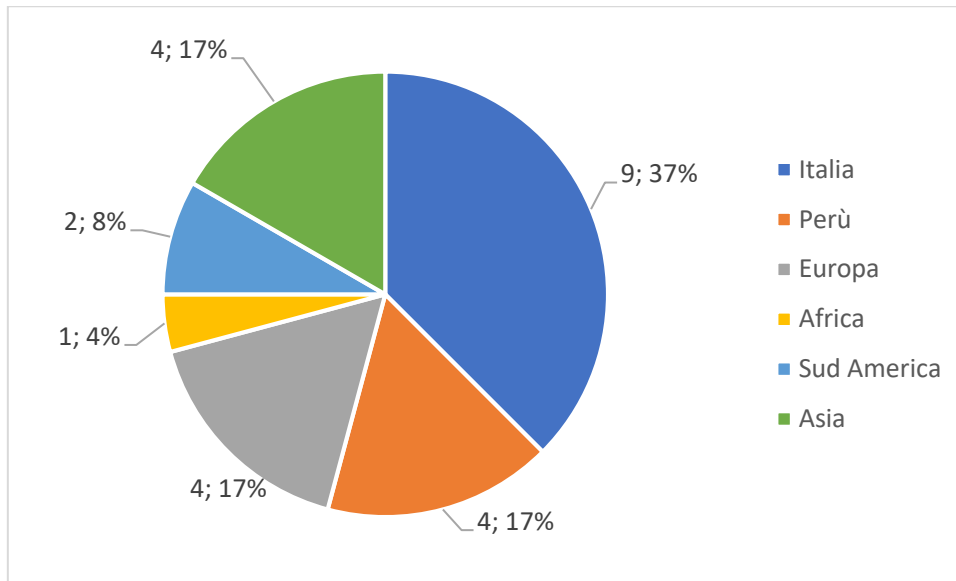
b- 12 SNP



- | | | | |
|------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| C-108-2019 | C-121-2019;C-30-2018 | C-8-2019 | C-64-2018 |
| C-122-2019 | C-125-2019 | C-151-2019 | C-32-2018 |
| C-86-2019 | C-26-2018 | C-75-2019 C147-2019 | C-51-2018 |
| C-88-2019 | C-43-2018 | C-148-2019 | C-52-2018 |
| C-66-2019 | C-87-2019 | C-36-2018 | C-13 2019 |
| C-4-2019 | C-138-2019 | C-21-2018 | C-21 2019 |
| C-114-2019 | C-142-2019 | C-34-2019 | C-64 2019; C-65 2019 |

Grafico 4. Nazionalità dei pazienti coinvolti nei cluster

a-5 SNP



b-12 SNP

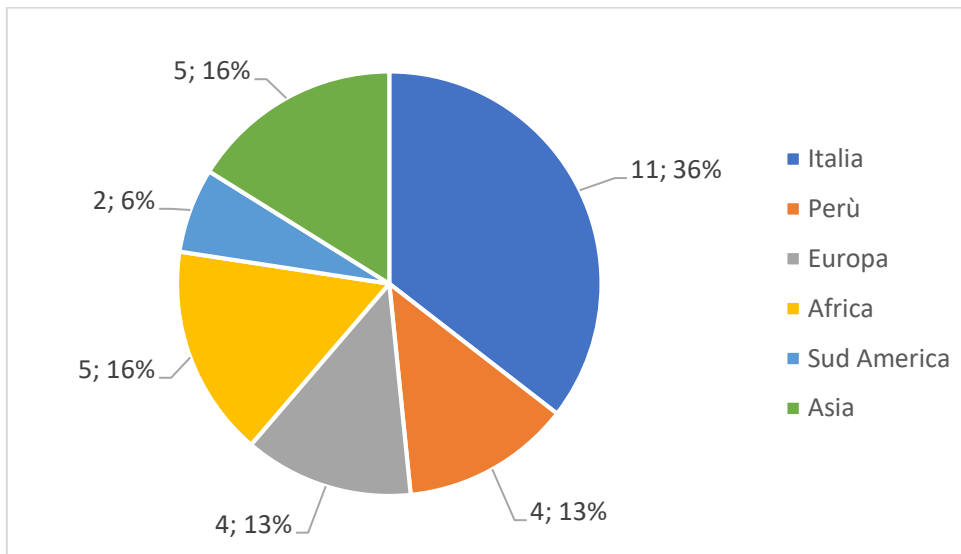


Tabella 6: Rielaborazione dei *cluster* in base a WGS e a dati epidemiologi

a- 5 SNP

cluster	ID1	ID2	ID3	ID4	Link epidemiologico
89	Italia Non bacillifero	India Non bacillifero	Romania Bacillifero		non noto
54	Italia Non bacillifero	Perù Non bacillifero	Albania Non bacillifero	Italia Non bacillifero	non noto
79	Perù Bacillifero	Italia Non bacillifero			conviventi
68	Italia Bacillifero	Italia Bacillifero			conviventi
104	Filippine Bacillifero	Italia Bacillifero			non noto
60	Camerun Bacillifero	Italia Bacillifero			non noto
41	Perù Non bacillifero	Italia Bacillifero	Perù Bacillifero		2 conviventi, 1 non noto
15	Cina Non bacillifero	Cina Non bacillifero			non noto
51	Brasile Bacillifero	Brasile Non bacillifero			non noto
21	Albania Bacillifero	Albania Bacillifero			conviventi

b- 12 SNP

cluster	ID1	ID2	ID3	ID4	Link epidemiologico
89	Italia Non bacillifero	India Non bacillifero	Romania Bacillifero		non noto
54	Italia Non bacillifero	Perù Non bacillifero	Albania Non bacillifero	Italia Non bacillifero	non noto
79	Perù Bacillifero	Italia Non bacillifero			conviventi
35	Senegal Bacillifero	Senegal Bacillifero	Senegal Bacillifero		non noto
68	Italia Bacillifero	Italia Bacillifero			conviventi
104	Filippine Bacillifero	Italia Bacillifero			non noto
60	Camerun Bacillifero	Italia Bacillifero			non noto
41	Perù Non bacillifero	Italia Bacillifero	Perù Bacillifero		2 conviventi, 1 non noto
90	Italia Bacillifero	Italia Non bacillifero			non noto
103	Filippine Bacillifero	Camerun Non bacillifero			non noto
15	Cina Non bacillifero	Cina Non bacillifero			non noto
51	Brasile Bacillifero	Brasile Non bacillifero			non noto
21	Albania Bacillifero	Albania Bacillifero			conviventi

Discussione

La TB rappresenta un significativo problema di sanità pubblica, anche per i Paesi a bassa incidenza, nei quali determinate fasce della popolazione possono avere un maggior rischio di sviluppare malattia tubercolare o maggior difficoltà ad accedere ai servizi sanitari. Nell'area fiorentina nel periodo di studio (2018-2020), in base ai dati raccolti, è possibile stimare un'incidenza di TB di circa 44 su 100.000 abitanti. Tra gli stranieri, le persone di nazionalità peruviana rappresentano la popolazione più numerosa tra le nuove diagnosi di TB (26, 22%), con un'incidenza stimata, rispetto alla popolazione peruviana residente a Firenze (circa 7.700), di 337 per 100.000 abitanti, più alta di quella stimata in Perù (116 per 100.000 ab) [1]. E' noto come i migranti abbiano un rischio aumentato di malattia tubercolare e come l'accesso al Servizio Sanitario Nazionale sia ritardato a causa di diversi fattori: percezione della TB come stigma, scarsa consapevolezza dei sintomi della TB, difficoltà di accesso alle cure per problematiche relative a condizione sociale e a mancata iscrizione al SSN. A questi fattori si aggiunge anche la difficoltà di diagnosi relativa a forme di TB extrapolmonari o a forme paucisintomatiche o con sintomi non patognomonic, molto spesso sottodiagnosticate o diagnosticate in ritardo [55]–[59]. Lo studio ha cercato di evidenziare le possibili dinamiche di trasmissione all'interno dell'area fiorentina, per eventualmente individuare delle azioni preventive, che possano contrastare la trasmissione, oltre che il ritardo di diagnosi.

Il tracciamento dei contatti secondo il sistema dei "cerchi concentrici", che si sviluppa in base al risultato positivo degli *screening*, allargandosi alla comunità solo nel caso vengano individuate categorie a rischio o sia sospettato un *outbreak* [54], [68], molto spesso è limitato dalla scarsa *compliance* dei soggetti nel fornire indicazioni su eventuali contatti e/o luoghi frequentati per problematiche relative alla percezione dello stigma e/o alle eventuali implicazioni legali (esempio *drug-user* o *sex-workers, homeless*) [69]–[71]. Tecniche di *contact tracing* basate sull'analisi delle relazioni esistenti tra i soggetti e i luoghi, che evidenzia la presenza e la natura di relazioni interpersonali che possono essere alla base della trasmissione della TB (*Social Network Analysis, SNA*), hanno acquisito negli anni sempre più evidenza, permettendo di individuare fonti di trasmissione e adottare azioni preventive per evitare ulteriori contagi [61]–[63]. L'importanza di individuare possibili luoghi di contagio oltre all'ambiente familiare, ad esempio luoghi di cura, luoghi di svago e di aggregazione, si dimostra fondamentale anche per ridurre la trasmissione di forme di TB MDR, permettendo di agire su tali *network* per azioni di prevenzione [75].

L'utilizzo del WGS può aiutare nell'analizzare dinamiche di trasmissione, individuare eventuali cross-contaminazioni e integrarsi con le informazioni ottenute dall'indagine epidemiologica, individuando

la presenza di eventuali *cluster* non identificati durante il *contact tracing*. Inoltre, il WGS fornisce informazioni su resistenze genotipiche, presentando un valore predittivo negativo per forme MDR del 100% e del 96% per i farmaci di prima linea [30]. Nel nostro studio, i casi di resistenza fenotipica a isoniazide sono stati confermati dall'analisi genotipica, così come il caso MDR, mentre il genotipo non ha confermato le resistenze fenotipiche a pirazinamide, portando a sospettare una possibile falsa resistenza fenotipica [30]. Cinque ceppi totisensibili ai test fenotipici hanno invece mostrato mutazioni associate in 2 casi a streptomina, 2 a fluorochinoloni e uno a etambutolo, non confermato dal punto di vista fenotipico. La discrepanza tra test fenotipico e genotipico relativa a streptomina e fluorochinoloni è legata al fatto che tali farmaci non vengono testati fenotipicamente di routine in caso di sensibilità ai farmaci di prima linea (ceppi non MDR). Nel nostro studio, l'applicazione del WGS ha permesso di individuare nello stesso paziente, ceppi con mutazioni sviluppate durante il trattamento, facendo ipotizzare la possibile scarsa aderenza al trattamento o il dosaggio inappropriato del farmaco o alterazioni dell'assorbimento dei farmaci stessi [76]. Dal punto di vista clinico, 3 di questi pazienti hanno presentato guarigione clinica e radiologica, uno è deceduto.

La prevalenza dei *lineages* mainly T, Haarlem e LAM conferma i dati precedentemente descritti in Toscana da uno studio precedente, che ha valutato gli isolati da febbraio 2016 a settembre 2017 [30].

Dai dati nel nostro studio emerge come i casi di TB rimangano prevalenti nella popolazione straniera e come i pazienti di nazionalità peruviana siano la maggioranza rispetto alle altre, a differenza dell'ultimo report dell'ASL 10 del 2014, in cui il Paese di provenienza nel 24% dei casi era la Romania [10]. Oltre a rappresentare una fascia di popolazione vulnerabile, gli stranieri rappresentano, nella realtà fiorentina, un *target* su cui indirizzare delle azioni di miglioramento sia per quanto riguarda il mantenimento in cura sia per quanto riguarda il tracciamento dei contatti. Infatti, dai nostri dati emerge come 10 pazienti su 11 persi al *follow up* siano di nazionalità straniera, in particolare il 27.3% di nazionalità peruviana, a conferma dell'opportunità di indirizzare azioni di informazione ed educazione a popolazioni *target*, come quella peruviana, per migliorare l'aderenza alle cure e la conoscenza della TB sia come malattia sia come patologia prevenibile e curabile.

L'analisi del WGS, pur su un numero limitato di campioni, ha confermato *cluster* noti all'indagine epidemiologica, confermando l'alta sensibilità del test; contemporaneamente ha evidenziato, rispettivamente in base a 5 e 12 SNP, 6 e 9 *cluster* in cui i dati del *contact tracing* non hanno permesso di stabilire un nesso epidemiologico, anche integrando l'informazione riguardo al

domicilio dei casi. Prendendo come *gold standard* il WGS, la sensibilità dell'indagine epidemiologica risulta bassa (circa 26%). La natura retrospettiva dello studio non ha permesso di ottenere informazioni aggiuntive relative a occupazione, eventuali *hobbies* e/o attività ricreative che potessero rappresentare occasione di contagio. Studi precedenti evidenziano come un'analisi più accurata del *social network* (SNA) potrebbe portare in luce eventuali modalità di trasmissione e potrebbe integrare i dati ottenuti [70]. Anche analizzando la composizione dei *cluster* con apparente assenza di collegamento epidemiologico, in 4 *cluster* i casi presentavano stessa nazionalità, mentre in 5 di essi la nazionalità era diversa, a confermare la possibile componente legata a un *network* non noto comune e/o a fattori sociali e/o culturali. Confrontando le due popolazioni (pazienti in *cluster* e non in *cluster*), in base a 12 SNP non emergono differenze statisticamente significative tra i due gruppi e non si evidenziano pertanto fattori di rischio attribuibili alla popolazione in *cluster*; prendendo in considerazione 5 SNP, l'unica differenza statisticamente significativa riguarda la presenza di una forma polmonare bacillifera, mentre è confermata l'assenza di altri fattori di rischio. Lo studio mette in evidenza come l'indagine epidemiologica non possa essere limitata al tracciamento dei contatti, ma sia necessaria un'attenta valutazione del contesto sociale e una valutazione delle possibili relazioni transculturali, avvalendosi anche di mediatori culturali per facilitare l'approccio con il caso e vincere eventuali reticenze. Superare la percezione della TB come stigma da parte della popolazione straniera, ma probabilmente anche italiana, permetterebbe di ottenere dati più esaustivi e una migliore aderenza al percorso diagnostico-terapeutico.

La collaborazione tra più figure professionali e più Enti è necessaria per intervenire su una popolazione *target*, come quella peruviana, che rappresenta a Firenze una delle comunità più numerose e che in diversi studi, compreso il nostro, si conferma come a maggior rischio di TB. Potenziare pertanto la collaborazione tra Dipartimento di Prevenzione della Asl 10 di Firenze, il Centro di Salute Globale della Regione Toscana, il Consolato Generale del Perù a Firenze, l'Unità di Malattie Infettive del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica dell'Università di Firenze e le Malattie Infettive dell'Ospedale di Santa Maria Annunziata, Firenze potrebbe permettere di ottenere una maggior consapevolezza dei rischi correlati alla patologia, favorire il *contact tracing* avvalendosi della collaborazione di mediatori culturali, ottenendo un miglior controllo della trasmissione della TB all'interno della comunità peruviana. Lo studio evidenzia la complessità della trasmissione della TB e l'impossibilità di prescindere da una conoscenza della comunità stessa, dall'ottenimento di dati sociali e culturali e quindi dalla necessità di ottimizzare il *contact tracing* attraverso una sensibilizzazione e un superamento delle barriere culturali.

Conclusioni

Lo studio della trasmissione della TB in setting a bassa prevalenza è finalizzato a individuare la presenza di eventuali *cluster* o fattori di rischio per programmare e attuare azioni di prevenzione. I limiti dati dall'indagine epidemiologica tradizionale, evidenziati e attribuiti alla percezione della malattia come stigma e a reticenze culturali, possono essere in parte superati dal sequenziamento genomico, che può evidenziare modalità di trasmissione non note, ma è anche necessario avvalersi della collaborazione della comunità per attuare delle azioni di educazione rivolte a superare tali ostacoli. Nella realtà fiorentina la comunità peruviana, nonostante l'integrazione avvenuta negli anni, si conferma la comunità a maggior rischio per TB e la comunità maggiormente coinvolta, insieme a quella italiana, nei *cluster* di trasmissione. Saranno pertanto necessarie azioni di prevenzione e di educazione rivolte a tale comunità con la collaborazione del Dipartimento di Prevenzione della Asl 10 di Firenze, il Centro di Salute Globale della Regione Toscana, il Consolato Generale del Perù a Firenze. Interessante inoltre sarà ampliare la popolazione in studio e cercare, attraverso mediatori culturali, di ottenere informazioni aggiuntive relative ai *social network* dei soggetti coinvolti all'interno di *cluster*.

Bibliografia

- [1] World Health Organization, *Global Tuberculosis Report 2021*. 2021. [Online]. Available: <http://apps.who.int/bookorders>.
- [2] MC Raviglione, *Harrison's Principles of internal medicine, McGrawHill*, XIX. 2015.
- [3] D. Heemskerk, M. Caws, B. Marais, and J. Farrar, "Tuberculosis in Adults and Children." [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/10138>
- [4] Geneva: World Health Organization, "Coronavirus (COVID-19) dashboard [website]. (<https://covid19.who.int/>)."
- [5] *Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis*. [Online]. Available: <http://apps.who.int/bookorders>.
- [6] World Health Organization., *Global tuberculosis report 2020*. World Health Organization, 2020.
- [7] European Centre for Disease Prevention and Control, "Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe," 2021.
- [8] V. Alarcón, E. Alarcón, C. Figueroa, and A. Mendoza-Ticona, "Tuberculosis in Peru: Epidemiological situation, progress and challenges for its control," *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, vol. 34, no. 2, pp. 299–310, Apr. 2017, doi: 10.17843/rpmesp.2017.342.2384.
- [9] N. Quispe *et al.*, "The fourth national anti-tuberculosis drug resistance survey in Peru," *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 24, no. 2, pp. 207–213, Feb. 2020, doi: 10.5588/ijtld.19.0186.

- [10] P Naldoni, S Baretto, O Baroncini, and MG Santini, "La tubercolosi nella ASL 1 0," 2014.
- [11] Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali, "La Comunità peruviana in Italia- Rapporto annuale sulla presenza dei migranti", [Online]. Available: <https://www.lavoro.gov.it/documenti-e-norme/studi-e-statistiche/Documents/Rapporti%20annuali%20sulle%20comunit%C3%A0%20migranti%20in%20Italia%20-%20anno%202020/Per%C3%B9-sintesi-2020.pdf>
- [12] L. Zammarchi *et al.*, "High prevalence of clustered tuberculosis cases in Peruvian migrants in Florence, Italy," *Infectious Disease Reports*, vol. 6, no. 4, pp. 45–47, 2014, doi: 10.4081/idr.2014.5646.
- [13] Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali-Direzione generale dell'Immigrazione e delle Politiche di integrazione, *La comunità peruviana in Italia. Rapporto annuale sulla presenza degli immigrati-2017*. 2017.
- [14] M. Barbier and T. Wirth, "The Evolutionary History, Demography, and Spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex," *Microbiology Spectrum*, vol. 4, no. 4, Aug. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.tbtb2-0008-2016.
- [15] J. E. Galagan, "Genomic insights into tuberculosis," *Nature Reviews Genetics*, vol. 15, no. 5. Nature Publishing Group, pp. 307–320, 2014. doi: 10.1038/nrg3664.
- [16] CDC, "Transmission and pathogenesis of Tuberculosis".
- [17] G. Churchyard *et al.*, "What We Know about Tuberculosis Transmission: An Overview," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 216. Oxford University Press, pp. S629–S635, 2017. doi: 10.1093/infdis/jix362.
- [18] C. Scarparo and M. T. Mascellino, "LINEE GUIDA Proposta di linee-guida per la diagnosi microbiologica della tubercolosi," 1999. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/242397913>
- [19] World Health Organization, *Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis : policy statement*.
- [20] E Tortoli, "Mycobacteria."
- [21] E. Tagliani, V. Nikolayevskyy, E. Tortoli, and D. M. Cirillo, "Laboratory diagnosis," *ERS Monograph*, vol. 2018, no. 9781849841009, pp. 99–115, 2018, doi: 10.1183/2312508X.10021318.
- [22] D. M. Lewinsohn *et al.*, "Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 64, no. 2. Oxford University Press, pp. e1–e33, Jan. 15, 2017. doi: 10.1093/cid/ciw694.
- [23] CL Daley and LM Kawamura, "The role of molecular epidemiology in contact investigations: a US perspective," 2003.
- [24] "Cluster of tuberculosis cases among exotic dancers and their close contacts— Kansas, 1994–2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2001."
- [25] N. N. Bock, J. P. Mallory, N. Mobley, B. Devoe, and B. Brooks Taylor, "Outbreak of Tuberculosis Associated with a Floating Card Game in the Rural South: Lessons for Tuberculosis Contact Investigations." [Online]. Available: <https://academic.oup.com/cid/article/27/5/1221/480421>
- [26] P. E. Breese *et al.*, "The Effect of Changes in Laboratory Practices on the Rate of False-Positive Cultures for *Mycobacterium tuberculosis*," 2001.
- [27] CL Daley, "Molecular epidemiology: a tool for understanding control of tuberculosis transmission," *Clin Chest Med*, vol. 26, pp. 217–231, 2005.

- [28] N. Malakmadze *et al.*, “Unsuspected Recent Transmission of Tuberculosis among High-Risk Groups: Implications of Universal Tuberculosis Genotyping in Its Detection,” 2005. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/cid/article/40/3/366/301768>
- [29] M. A. Behr and P. M. Small, “Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: How Can It Help the Clinician?” [Online]. Available: <https://academic.oup.com/cid/article/25/4/806/327961>
- [30] A. M. Cabibbe *et al.*, “Countrywide implementation of whole genome sequencing: An opportunity to improve tuberculosis management, surveillance and contact tracing in low incidence countries,” *European Respiratory Journal*, vol. 51, no. 6. European Respiratory Society, Jun. 01, 2018. doi: 10.1183/13993003.00387-2018.
- [31] V. Nikolayevskyy, K. Kranzer, S. Niemann, and F. Drobniowski, “Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review,” *Tuberculosis*, vol. 98. Churchill Livingstone, pp. 77–85, May 01, 2016. doi: 10.1016/j.tube.2016.02.009.
- [32] T. M. Walker, P. Monk, E. G. Smith, and T. E. A. Peto, “Contact investigations for outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis*: Advances through whole genome sequencing,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 19, no. 9. Blackwell Publishing Ltd, pp. 796–802, 2013. doi: 10.1111/1469-0691.12183.
- [33] J. A. Guerra-Assunçã *et al.*, “Large-scale whole genome sequencing of *M. tuberculosis* provides insights into transmission in a high prevalence area”, doi: 10.7554/eLife.05166.001.
- [34] T. M. Walker *et al.*, “Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: A retrospective observational study,” *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 13, no. 2, pp. 137–146, Feb. 2013, doi: 10.1016/S1473-3099(12)70277-3.
- [35] A. C. Schürch *et al.*, “High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 9, pp. 3403–3406, Sep. 2010, doi: 10.1128/JCM.00370-10.
- [36] T. A. Kohl *et al.*, “Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: A standardized, portable, and expandable approach,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 52, no. 7, pp. 2479–2486, 2014, doi: 10.1128/JCM.00567-14.
- [37] C. B. Ford *et al.*, “Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection,” *Nature Genetics*, vol. 43, no. 5, pp. 482–488, May 2011, doi: 10.1038/ng.811.
- [38] E. Tagliani *et al.*, “Use of a whole genome sequencing based approach for *Mycobacterium tuberculosis* surveillance in Europe in 2017-2019: An ECDC pilot study,” *European Respiratory Journal*, vol. 57, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1183/13993003.02272-2020.
- [39] L. J. Pankhurst *et al.*, “Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: A prospective study,” *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 49–58, Jan. 2016, doi: 10.1016/S2213-2600(15)00466-X.
- [40] J. G. Ravenel *et al.*, “ACR Appropriateness Criteria® Imaging of Possible Tuberculosis,” *Journal of the American College of Radiology*, vol. 14, no. 5, pp. S160–S165, May 2017, doi: 10.1016/j.jacr.2017.02.022.
- [41] G Cittadini, G Cittadini, and F Sardanelli, *Diagnostica per immagini e radioterapia*, I. 2015.

- [42] J. J. Yeon and K. S. Lee, "Pulmonary tuberculosis: Up-to-date imaging and management," *American Journal of Roentgenology*, vol. 191, no. 3. pp. 834–844, Sep. 2008. doi: 10.2214/AJR.07.3896.
- [43] B. E. Jones *et al.*, "Chest Radiographic Findings in Patients with Tuberculosis with Recent or Remote Infection," 1997.
- [44] E. Geng, B. Kreiswirth, J. Burzynski, and N. W. Schluger, "Clinical and Radiographic Correlates of Primary and Reactivation Tuberculosis A Molecular Epidemiology Study." [Online]. Available: <https://jamanetwork.com/>
- [45] S. M. Ellis, "The spectrum of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infection," *European Radiology, Supplement*, vol. 14, no. 3. 2004. doi: 10.1007/s00330-003-2042-1.
- [46] W Fox, GA Ellard, and da Mitchison, "Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis Units, 1946–1986, with relevant subsequent publications," 1999.
- [47] D. Mitchison and G. Davies, "The chemotherapy of tuberculosis: Past, present and future," *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 16, no. 6. pp. 724–732, Jun. 01, 2012. doi: 10.5588/ijtld.12.0083.
- [48] P. P. J. Phillips, K. Fielding, and A. J. Nunn, "An Evaluation of Culture Results during Treatment for Tuberculosis as Surrogate Endpoints for Treatment Failure and Relapse," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, May 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0063840.
- [49] P. Nahid *et al.*, "Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 63, no. 7. Oxford University Press, pp. e147–e195, Oct. 01, 2016. doi: 10.1093/cid/ciw376.
- [50] World Health Organization, *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4, Treatment : drug-resistant tuberculosis treatment.*
- [51] F. Conradie *et al.*, "Treatment of Highly Drug-Resistant Pulmonary Tuberculosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 382, no. 10, pp. 893–902, Mar. 2020, doi: 10.1056/nejmoa1901814.
- [52] F Conradie, "High rate of successful outcome treating highly resistant TB in the ZeNix study of pretomanid, bedaquiline and alternative doses and duration of linezolid."
- [53] A. Zumla, M. Raviglione, R. Hafner, and C. Fordham von Reyn, "Tuberculosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 368, no. 8, pp. 745–755, Feb. 2013, doi: 10.1056/nejmra1200894.
- [54] "Tuberculosis NICE guideline," 2016. [Online]. Available: www.nice.org.uk/guidance/ng33
- [55] C. Lienhardt, "From Exposure to Disease: The Role of Environmental Factors in Susceptibility to and Development of Tuberculosis," 2001. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/epirev/article/23/2/288/510378>
- [56] D. G. Storla, S. Yimer, and G. A. Bjune, "A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis," *BMC Public Health*, vol. 8. BioMed Central Ltd., 2008. doi: 10.1186/1471-2458-8-15.
- [57] B. A. Tomás, C. Pell, A. B. Cavanillas, J. G. Solvas, R. Pool, and M. Roura, "Tuberculosis in migrant populations. A systematic review of the qualitative literature," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 12. Dec. 05, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0082440.
- [58] Z. Kamper-Jørgensen *et al.*, "Migrant tuberculosis: The extent of transmission in a low burden country," *BMC Infectious Diseases*, vol. 12, Mar. 2012, doi: 10.1186/1471-2334-12-60.

- [59] L. R. Codecasa *et al.*, "Tuberculosis among immigrants from developing countries in the province of Milan, 1993-1996," 1999.
- [60] BC Centre for Disease Control, "Communicable Disease Control Manual-Tuberculosis-Contact Investigation," 2019.
- [61] "Morbidity and Mortality Weekly Report Guidelines for the Investigation of Contacts of Persons with Infectious Tuberculosis Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC Guidelines for Using the QuantiFERON[®]-TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection, United States."
- [62] A. S. Klovdahl *et al.*, "Networks and tuberculosis: an undetected community outbreak involving public places," 2001.
- [63] G. de Vries, R. A. H. van Hest, C. C. A. Burdo, D. van Soolingen, and J. H. Richardus, "A Mycobacterium tuberculosis cluster demonstrating the use of genotyping in urban tuberculosis control," *BMC Infectious Diseases*, vol. 9, p. 151, Sep. 2009, doi: 10.1186/1471-2334-9-151.
- [64] V. J. Cook, L. Shah, J. Gardy, and A. C. Bourgeois, "Recommendations on modern contact investigation methods for enhancing tuberculosis control," *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, vol. 16, no. 3. pp. 297–305, Mar. 01, 2012. doi: 10.5588/ijtld.11.0350.
- [65] T. M. Walker *et al.*, "Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: A retrospective observational study," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 13, no. 2, pp. 137–146, Feb. 2013, doi: 10.1016/S1473-3099(12)70277-3.
- [66] N. Alaridah *et al.*, "Transmission dynamics study of tuberculosis isolates with whole genome sequencing in southern Sweden," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-39971-z.
- [67] C. J. Meehan *et al.*, "The relationship between transmission time and clustering methods in *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology," *EBioMedicine*, vol. 37, pp. 410–416, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.ebiom.2018.10.013.
- [68] "Morbidity and Mortality Weekly Report Guidelines for the Investigation of Contacts of Persons with Infectious Tuberculosis Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC Guidelines for Using the QuantiFERON[®]-TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection, United States."
- [69] T. Burki, "Tackling tuberculosis in London's homeless population," *The Lancet*, vol. 376, no. 9758, pp. 2055–2056, 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)62282-9.
- [70] A. Tardin, M. Dominicé Dao, B. Ninet, and J. P. Janssens, "Tuberculosis cluster in an immigrant community: Case identification issues and a transcultural perspective," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 14, no. 9, pp. 995–1002, Sep. 2009, doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02325.x.
- [71] R. J. Asghar *et al.*, "Limited utility of name-based tuberculosis contact investigations among persons using illicit drugs: Results of an outbreak investigation," *Journal of Urban Health*, vol. 86, no. 5, pp. 776–780, Sep. 2009, doi: 10.1007/s11524-009-9378-z.
- [72] L. K. Fitzpatrick *et al.*, "A Preventable Outbreak of Tuberculosis Investigated through an Intricate Social Network," 2001. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/cid/article/33/11/1801/442724>
- [73] PD McElroy *et al.*, "A network-informed approach to investigating a tuberculosis outbreak: implications for enhancing contact investigations," *Int J Tuberc Lung Dis*, vol. 7(12), pp. S486–S493, 2003.

- [74] M. Andre *et al.*, "Transmission network analysis to complement routine tuberculosis contact investigations," *American Journal of Public Health*, vol. 97, no. 3, pp. 470–477, Mar. 2007, doi: 10.2105/AJPH.2005.071936.
- [75] D. P. Bui *et al.*, "A case-control study to identify community venues associated with genetically-clustered, multidrug-resistant tuberculosis disease in Lima, Peru," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 68, no. 9, pp. 1547–1555, Apr. 2019, doi: 10.1093/cid/ciy746.
- [76] C. B. Ford *et al.*, "*Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis," *Nature Genetics*, vol. 45, no. 7, pp. 784–790, Jul. 2013, doi: 10.1038/ng.2656.