

PCR per BK su BAL nella diagnostica precoce di lobite tubercolare

Use of PCR for TB bacteria on BAL in early diagnosis of tubercular lobitis

Alfredo Franco¹, Lucia Aprea¹, Marco Conte², Elio Manzillo¹,
Alessandro Marocco¹, Fiorella Martucci³, Roberto Parrella⁴,
Teresa Pizzella¹, Francesco Simioli¹, Crescenzo Maria Izzo¹

¹VIII Divisione di Malattie Infettive ad Alta Complessità;

²Laboratorio di analisi cliniche-UOS di Batteriologia;

³V Divisione di Malattie Infettive ad Alta Complessità;

⁴III Divisione di Malattie Infettive ad Alta Complessità, A.O.R.N. Cotugno, Napoli, Italy

La tubercolosi è ancora la prima causa di morte al mondo per singolo agente infettivo. I numeri parlano di una prevalenza complessiva mondiale di oltre 2 miliardi di soggetti infetti e di oltre 9 milioni di nuovi casi/anno capaci di provocare quasi 2 milioni di morti [1]. Una recente classificazione delle patologie infettive mondiali inquadra questa affezione come una malattia persistente (insieme all'AIDS ed alla malaria) [2]. Ma l'ultimo rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ci chiarisce che al decremento dell'incidenza in alcune aree del mondo (Medio Oriente e Nord Africa) corrisponde un analogo incremento in altre aree (Europa dell'Est, Estremo Oriente ed Africa Sub-Sahariana) e che, complessivamente, nei paesi industrializzati l'incidenza di tubercolosi è correlabile con i flussi migratori [1, 3]. Proprio per questo motivo, nel nostro paese la TBC polmonare può essere considerata una patologia ri-emergente in virtù sia della diffusione dell'infezione da HIV (cui essa può essere correlata nell'ambito di una frequente coinfezione) sia dell'emergenza di ceppi micobatterici resistenti ai farmaci abitualmente utilizzati di prima e/o di seconda linea (MDR, *multidrug-resistant*, e/o XDR, *extensively drug-resistant*) ancor più frequenti nei paesi ad alta incidenza di malattia o con alti flussi migratori dagli stessi [4, 5]. Un'ultima riflessione va posta in tema di "sorveglianza epidemiologica" in rapporto alla inopportuna dismissione o alla riconversione di molte divisioni di tisiologia (vecchi "sanatori") operata nel nostro paese negli anni '80 in conseguenza della temporanea riduzione dell'incidenza tubercola-

re. Per quanto concerne la diagnostica della tubercolosi polmonare è da notare che, pur restando immutata la validità delle tecniche diagnostiche classiche (diretto per bacilli alcool-acido resistenti [BAAR], colturale per BK, Rx del torace ecc.), i tests che utilizzano l'amplificazione degli acidi nucleici (NAT) basati sulla PCR, hanno consentito, in mani esperte, una più rapida identificazione dei micobatteri comportando talvolta un più precoce trattamento dei pazienti ed un più rapido isolamento degli stessi [6-9].

CASO CLINICO

Nel Giugno 2008 si presenta alla nostra osservazione un giovane operaio (manutentore esposto professionalmente a gas e polveri sottili) di 23 anni immunocompetente lamentando da circa 2 mesi occasionale tosse stizzosa senza febbre con escreato talvolta striato di sangue e mostrando due Rx ed una TC del torace (Figura 1), eseguite rispettivamente 60, 40 e 20 gg prima, che evidenziavano sfumati segni radiologici di un piccolo processo infiammatorio alla base polmonare di dx (lobite). Il paziente aveva già praticato trattamenti antibiotici empirici (amoxicillina in prima istanza e, successivamente, ceftriaxone + ciprofloxacina + betametasone) che, di fatto, non avevano modificato il quadro radiologico. L'anamnesi patologica remota era negativa per patologie infettive e per allergopatie mentre l'intradermoreazione di Mantoux, effettuata 15 gg prima presso l'ambu-



Figura 1 - TC del torace del 26.05.08 che evidenzia il processo infiammatorio al lobo basale di dx.



Figura 2 - Rx del torace del 27.06.08 che evidenzia la persistente lobite basale dx.

latorio della ASL, risultava ugualmente negativa. Alla prima osservazione in D.H. le condizioni cliniche generali erano buone e l'esame obiettivo generale risultava fondamentalmente negativo, tranne che per qualche rumore secco alla auscultazione delle basi polmonari bilateralmente e per una lievissima epatomegalia. Vengono effettuati esami di routine, espettorati per germi comuni, miceti e BK (diretto, culturale e PCR), tamponi faringei, linguali e tonsillari ed una sierologia virologica molto ampia (adenovirus, parvovirus B19, coxsackie, micoplasma e virus sinciziale respiratorio). Al soggetto viene consigliata una ulteriore terapia antibiotica empirica (piperacillina 4 g + tazobactam 0,5 g/die per 10 gg) associata a prednisone (50 mg/die per 7 gg e poi a scalare) ed acetilcisteina (600 mg/die per 15 gg) in attesa dei risultati. A 10 gg dal primo controllo in D.H., il paziente ritorna alla nostra osservazione. L'esito degli esami eseguiti è fondamentalmente negativo, se si eccettua un discreto incremento della Proteina C Reattiva pari a 7,2 mg/dl, un titolo anti-streptolisinico di 344 UI/ml ed il riscontro di *Staphylococcus aureus* all'esame dell'espettorato; ugualmente negativi sono la PCR ed il diretto per BK, gli esami sierologici per i virus esaminati e i tamponi, mentre l'immunocompetenza è testimoniata da un valore di CD4 pari a 461 cellule/mcl e da un rapporto CD4/CD8 paria a 1,30. Visto che, dopo la terapia, il quadro radiologico del 27.06.08 risulta immutato con referto di "Presenza di multipli addensamenti nodulari in sede paracardiaca basale a dx con disomogeneità parenchimale in regione peri-ilare omologa e basale a

sx. Adenopatia ilare più evidente a sx. Diaframma risalito a dx con sinechia pleurica omologa" (Figura 2) e che l'unico esame ancora in corso è quello colturale per BK su espettorato, non ritenendo valida l'ipotesi etiologica di polmonite stafilococcica, si prenota una esame broncoscopico con valutazione batteriologica del liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL) [10]. Dopo aver eseguito un esame spirometrico (nella norma) propedeutico per la fibro-endoscopia bronchiale, in data 11.07.08 si effettua la broncoscopia (Figura 3) che evidenzia "Normopervietà bronchiale a tutti i livelli con mucosa iperemica ed a tratti congesta. Sono presenti scarse secrezioni dense e vischiose a carattere siero-mucoso". Sul liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL) viene richiesto al laboratorio un citogramma bronchiolo-alveo-

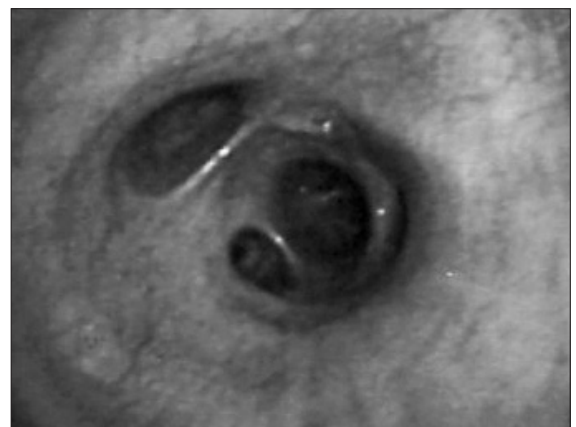


Figura 3 - Broncoscopia dell'11.07.08 che evidenzia l'iperemia e la congestione della mucosa.



Figura 4 - Rx del torace del 28.10.08 (90° giorno dall'inizio della terapia efficace) che mostra una completa risoluzione del processo lobitico.

lare (negativo per cellule maligne), un esame batteriologico ed una ricerca per BK (diretto, colturale e PCR). Risultando positiva per *Mycobacterium tuberculosis* la PCR sul BAL (con diretto per BK negativo), si riesce a far diagnosi di lobite specifica in data 13.07.09, a poco più di 20 gg dalla prima osservazione. Nel corso del successivo ricovero, il paziente viene avviato a terapia specifica con rifampicina (RMP) 600 mg/die + isoniazide (INH) 300 mg/die + etambutolo (EMB) 1500 mg/die + pirazinamide (PZA) 2000 mg/die.

La suddetta terapia viene successivamente modificata (dopo 10 gg) in rapporto alla valutazione dell'esame dell'espettorato al tempo zero (arrivato a 40 gg. dalla valutazione iniziale) che evidenzia crescita di ceppi micobatterici primariamente MDR (resistenza ad INH ed EMB), confermati qualche settimana dopo anche dal colturale sul BAL. Viene quindi iniziata una terapia a 4 farmaci con RMP+PZA+streptomicina (SM) + levofloxacina (LFX) (SM 1 g/die + LFX 500 mg/die + RMP + PZA ai dosaggi già utilizzati) per 2 mesi, successivamente seguita da una terapia a 3 farmaci (RMP+PZA+LFX) allo stesso dosaggio per ulteriori 5 mesi [11, 12]. Attualmente (ottavo mese di terapia) il paziente sta proseguendo una terapia a 2 farmaci (RMP+PZA) che si è intenzionati a prostrarre, se il *follow-up* radiologico e batteriologico continuerà ad essere negativo, per almeno altri 12 mesi. Nel corso dei *follow-up*, eseguiti in media circa ogni 30-45 gg in regime di D.H., l'esame diretto e la PCR per BK su espettorato sono sempre risultati negativi, il colturale per BK è

risultato positivo solo al 1° *follow-up* (40° giorno dall'inizio della terapia) mentre il quadro radiologico si è normalizzato al 2° *follow-up* (90° giorno dall'inizio della terapia) (Figura 4) epoca in cui il paziente ha ripreso la propria attività lavorativa (i diretti per BAAR erano sempre risultati negativi). Non si sono verificati eventi avversi gravi o effetti collaterali in rapporto alla terapia specifica utilizzata, se si esclude una lieve iperuricemia da pirazinamide trattata con allopurinolo alla dose di 300 mg/die.

C'è da segnalare, in particolare, che la levofloxacina (LFX) non ha provocato le tendinopatie frequentemente descritte nel suo utilizzo prolungato e che la stessa streptomicina è stata maneggevole nell'utilizzo e priva di tossicità renale o cocleo-vestibolare [13-16]. La valutazione del ceppo MDR ha consentito di effettuare opportuna profilassi (per 6 mesi con RMP) anche per un convivente (padre) del paziente risultato positivo all'intradermoreazione di Mantoux e al test Quantiferon TB-Gold eseguiti.

■ DISCUSSIONE

Dal caso clinico riportato si evidenzia come la tubercolosi polmonare sia ritornata ad essere una patologia con la quale confrontarsi nella pratica clinica quotidiana e come l'utilizzo precoce di tecniche di amplificazione (PCR) su BAL consenta, in mani esperte, di diagnosticare piccoli processi polmonari con caratteristiche radiologiche aspecifiche (lobiti) ancor prima dell'esito degli esami colturali sull'espettorato. Tutto ciò può comportare un più precoce trattamento dei pazienti, un più rapido isolamento degli stessi (interruzione della trasmissione) ed una migliore prognosi della malattia. Nel nostro caso, ci preme sottolineare come l'evidenza di un ceppo MDR abbia condizionato la necessità di scegliere un cocktail farmacologico (RMP+PZA+SM+LFX) a bassa "attività battericida precoce" (tipica invece dell'INH) che è in connessione con la persistente positività dell'esame colturale al 40° giorno di terapia; nello stesso tempo, l'utilizzo di due farmaci ad alta "attività sterilizzante" (RMP+PZA) si rapporta invece con gli evidenti e più lenti miglioramenti (negatività dell'esame colturale e dell'esame radiologico) evidenziati al 90° giorno di terapia [17, 18]. D'altro canto, l'utilizzo della levofloxacina (che rappresenta uno dei pochi farmaci di seconda linea recentemente introdotti nel trattamento dei ceppi micobatterici

MDR) può essere una buona chance terapeutica se associata ad una sorveglianza sanitaria specialistica molto stretta [19].

In ultimo, è d'obbligo rimarcare una serie di riflessioni conclusive che potrebbero essere utili e di semplice applicazione per il medico di medicina generale:

- negli infiltrati polmonari che non si modificano con antibioticoterapia empirica bisogna sempre pensare alla TB anche quando i quadri radiologici non sono proprio tipici della malattia;
- una intradermoreazione di Mantoux negativa non esclude sicuramente un processo tubercolare (per errori tecnici nella lettura del test, per infezioni virali o batteriche concomitanti,

per l'utilizzo di farmaci corticosteroidi che alterano la reattività dell'organismo ecc.);

- è più corretto sottoporsi rapidamente ad un semplice esame dell'espettorato (diretto per BK, colturale per BK, germi comuni e miceti e PCR per BK) che eseguire ripetuti radiogrammi del torace o TC (in rapporto alla inopportuna e pericolosa sovraesposizione dell'organismo a radiazioni ionizzanti!);
- l'esame colturale dell'espettorato resta, comunque, un esame fondamentale sia nel confermare la diagnosi che nel modulare l'approccio terapeutico (in rapporto alla possibilità di evidenziare ceppi MDR e/o XDR).

Key words: TBC, lobitis, PCR.

RIASSUNTO

Nel Giugno 2008 si presenta alla nostra osservazione un giovane di 23 anni immunocompetente, senza febbre e con occasionale tosse stizzosa da circa 2 mesi, esibendo due Rx ed una TC del torace, eseguite rispettivamente 60, 40 e 20 gg prima, che mostravano segni di una piccola lobite alla base polmonare dx. Il paziente aveva già praticato terapie antibiotiche che non avevano modificato il quadro radiografico. Al primo controllo vengono effettuati esami di routine ed espettorati per germi comuni, miceti e BK (diretto, colturale e PCR), e viene praticata una nuova antibioticoterapia empirica (piperacillina/tazobactam). Dato che il quadro radiologico risulta immutato e che gli esami (PCR

e diretto per BK) risultano negativi, viene successivamente eseguita una broncoscopia con valutazione batteriologica del BAL che, risultando positiva per *Mycobacterium tuberculosis*, fa porre diagnosi di lobite tubercolare. Si effettua pertanto una terapia specifica - rifampicina (RMP), isoniazide (INH), etambutolo (EMB), pirazinamide (PZA) - modificata dopo 10 gg in rapporto all'evidenza di crescita di micobatteri resistenti ad INH ed EMB all'esame colturale dell'espettorato. Ne consegue che l'utilizzo precoce di tecniche di PCR su BAL consente, in mani esperte, di diagnosticare piccole lobiti aspecifiche ancor prima dell'esito degli esami colturali sull'espettorato.

SUMMARY

In June 2008 a 23-year-old immunocompetent came to our observation, without fever and with an occasional cough for 2 months, who showed two chest X-rays and a CT, performed respectively 60, 40 and 20 days earlier, that pointed to a small lobitis at the right lung base. The patient had already undergone several antibiotic therapies that had not changed the X-graphic framework. On presentation, routine blood tests and cultural examinations of sputum were carried out to detect common germs, fungi and TB bacteria (microscopic observation, cultivation and PCR), and a new antibiotic therapy (piperacillin/tazobactam) was started. Since the radiological picture appeared unchanged after 10 days of

*therapy and the examinations (microscopic observation and PCR) were negative, bronchoscopy with bacteriological evaluation of BAL was performed, which was positive to *Mycobacterium tuberculosis*, and then tubercular lobitis was diagnosed. Therefore a specific therapy - rifampin (RMP), isoniazid (INH), etambutol (EMB), pyrazinamid (PZA) - was started and changed after 10 days due to the growth of mycobacteria resistant to INH and EMB on examination of sputum. Consequently, the early use of PCR on BAL allows, in skilled hands, small aspecific lobitis to be diagnosed more rapidly than using cultural examination of sputum.*

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] WHO Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. Report 2008. Available on line at http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/fullreport.pdf.
- [2] Rappuoli R. From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat Med.* 10 (11), 1177-1185, 2004.
- [3] Che D., Antoine D. Immigrants and tuberculosis: recent epidemiological data. *Med. Mal. Infect.* 39 (3), 187-190, 2009.
- [4] Zager E.M., McNerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* 8 (10), 2008.
- [5] Lobue P., Sizemore C., Castro K.G. Plan to combat extensively drug-resistant tuberculosis recommendations of the federal tuberculosis task force. *MMWR Recomm. Rep.* 58 (RR3), 1-43, 2009.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Controlling Tuberculosis in the United States. Recommendations from the American Thoracic Society, CDC, and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 54. No. RR-12:19, 2005. Available on line at <http://www.cdc.gov/MMWR/PDF/rr/rr5412.pdf>
- [7] Taegtmeier M., Beeching N.J., Scott J., et al. The clinical impact of nucleic acid amplification tests on the diagnosis and management of tuberculosis in a British hospital. *Thorax* 63 (4), 317-321, 2008.
- [8] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 16, 58 (1), 7-10, 2009. Available on line at <http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/19145221>.
- [9] Campos M., Quartin A., Mendes E., et al. Feasibility of shortening respiratory isolation with a single sputum nucleic acid amplification test. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 178 (3), 300-305, 2008.
- [10] Pereira Gomes J.C., Pedreira W.L.J., Araujo E., et al. Impact of BAL in the management of pneumonia with treatment failure. *Chest* 118, 1739-1746, 2000.
- [11] Ziganshina L.E., Squire S.B. Fluoroquinolones for treating tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev.* (1), CD004795, 2008.
- [12] Moadebi S., Harder C.K., Fitzgerald M.J., Elwood K.R., Marra F. Fluoroquinolones for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Drugs.* 67 (14), 2077-2099, 2007.
- [13] Gottschalk A.W., Bachman J.W. Death following bilateral complete Achilles tendon rupture in a patient on fluoroquinolone therapy: a case report. *J. Med. Case Reports* 3 (1), 2009.
- [14] Sugimoto T., Kaneko H., Deji N., Koya D. Levofloxacin-induced Achilles tendon rupture in a patient with systemic microscopic polyangiitis. *Mod. Rheumatol.* 5 (3), 217-219, 2005.
- [15] de Jager P., van Altena R. Hearing loss and nephrotoxicity in long-term aminoglycoside treatment in patients with tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 6 (7), 622-627, 2002.
- [16] Aouam K., Chaabane A., Loussaïef C., Ben Romdhane F., Boughattas N.A., Chakroun M. Adverse effects of antitubercular drugs: epidemiology, mechanisms, and patient management. *Med. Mal. Infect.* 37 (5), 253-261, 2007.
- [17] Mitchison D.A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle* 66 (3), 219-225, 1985.
- [18] Mitchison D.A. Mechanisms of the action of drugs in the short-course chemotherapy. *Bull. Int. Union Tuberc.* 60 (1-2), 36-40, 1985.
- [19] Richeldi L., Covi M., Ferrara G. et al. Clinical use of Levofloxacin in the long-term treatment of drug resistant tuberculosis. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 57 (1), 39-43, 2002.