

43. Appendice 3: i micobatteri

II edizione

Luigi Barbieri, Giovanna Testa e Roberto Rimondini-Giorgini



(vale per tutto il capitolo)

43. Appendice 3: i micobatteri.....	1353	43.3.6. Storia naturale della malattia.....	1365
43.1. I MICOBATTERI	1355	43.4. PATOGENESI E SISTEMA IMMUNITARIO.....	1366
43.1.1. Classificazione clinica operativa dei micobatteri tubercolari.....	1355	43.4.1. Infezione e colonizzazione dei macrofagi.....	1366
43.1.2. Caratteristiche generali.....	1356	43.4.2. Virulenza dei bacilli tubercolari.....	1367
43.2. LA TUBERCOLOSI	1357	43.4.3. Resistenza innata all'infezione.....	1367
43.2.1. Serbatoio d'infezione.....	1360	43.4.4. La risposta dell'ospite.....	1368
43.2.2. Vie di trasmissione.....	1360	43.4.5. Attivazione del sistema immunitario.....	1368
43.3. PATOGENESI	1361	43.4.6. La risposta immunitaria nella tubercolosi.....	1369
43.3.1. Predisposizione genetica.....	1361	43.4.7. La formazione dei granulomi: i tubercoli.....	1370
43.3.2. Dall'infezione alla malattia.....	1361	43.4.8. La risposta di attivazione macrofagica.....	1372
43.3.3. Infezione primaria.....	1362	43.4.9. La reazione di ipersensibilità ritardata.....	1372
43.3.4. Tubercolosi secondaria.....	1363	43.4.10. Ruolo dei monociti/macrofagi.....	1374
43.3.5. Evoluzione della malattia tubercolare.....	1364	43.4.11. Ruolo dei linfociti T.....	1375
43.4.12. Componenti lipidiche e proteiche dei micobatteri.....	1375	43.6.2. Raccolta dei campioni.....	1383
43.5. DIAGNOSI MICROBIOLOGICA	1376	43.6.3. Conservazione ed invio.....	1384
43.5.1. Ricerca microscopica di bacilli acido/alcool resistenti (BAAR).....	1377	43.6.4. Processazione (in laboratorio).....	1384
43.5.2. Esame colturale.....	1378	43.6.5. Referto.....	1384
43.5.3. Test alla tubercolina (TST, tuberculin skin test).....	1379	43.7. TERAPIA ANTIBIOTICA	1385
43.5.4. Amplificazione degli acidi nucleici.....	1382	43.7.1. Farmaco-resistenza.....	1387
43.6. PROCEDURE PER LA DIAGNOSI MICROBIOLOGICA.....	1383	43.8. LEBBRA (OPZIONALE).....	1388
43.6.1. Richiesta.....	1383	43.9. PRINCIPALI FONTI UTILIZZATE.....	1391



43.1. I micobatteri

43.1.1. CLASSIFICAZIONE CLINICA OPERATIVA DEI MICOBATTERI TUBERCOLARI

Tabella 44.79: Classificazione clinica operativa dei micobatteri tubercolari

Actinomycetales (ordine), **Mycobacteriaceae** (famiglia)

Responsabili delle varie forme di tubercolosi:

Mycobacterium tuberculosis complex

- *M. tuberculosis* (in passato *M. tuberculosis hominis* o bacillo di Koch)
- *M. bovis*
- altri più rari

Mycobacterium avium complex

- *M. avium*
- *M. intracellulare*
- altri più rari

Mycobacterium terrae complex

Mycobacterium fortuitum complex

Responsabili di altre malattie da micobatteri:

- *Mycobacterium leprae*
- altri più rari

43.1.2. CARATTERISTICHE GENERALI



Il *Mycobacterium tuberculosis* è un batterio a forma di bastoncino, asporigeno, aerobio, $0.2-0.5 \times 2-4 \mu\text{m}$

Componenti caratteristiche:

- parete cellulare ricca di glicolipidi (lipo-arabino-mannani, LAM)
- proteine (PPD, *protein purified derivative*)



La parete glico-lipidica conferisce una serie di proprietà:

- rende l'assorbimento di nutrienti lento con conseguente replicazione rallentata (mediamente 48 h)
- rende il batterio resistente all'ambiente esterno
- rende il batterio resistente alla fagocitosi ed alla uccisione da parte dei macrofagi
- rende il batterio impermeabile a molti antibiotici
- rende il batterio poco colorabile con il metodo di Gram (anche se appartiene per struttura ai Gram-positivi)
- rende il batterio resistente alla decolorazione con alcool-acido nel metodo di Ziehl-Nielsen

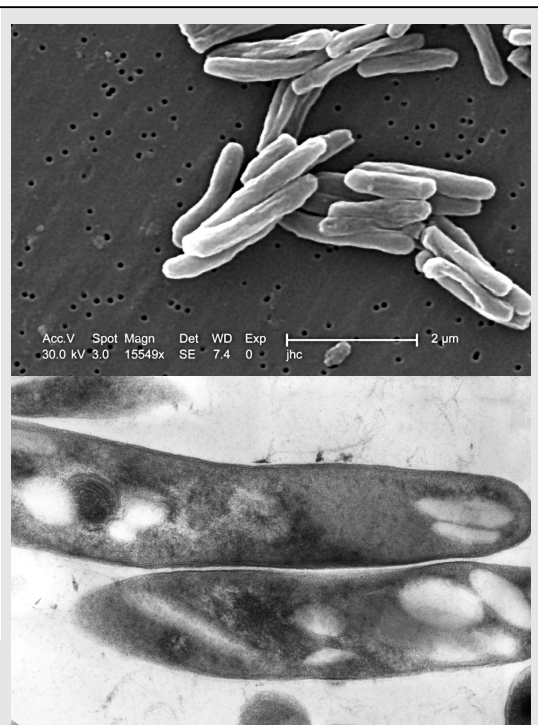


Figura 43.1. *Mycobacterium tuberculosis* al microscopio elettronico a scansione (in alto) e trasmissione (in basso). Immagini public domain fornite da CDC/Dr. Ray Butler (in alto); Janice Carr e CDC/Elisabeth "Libby" White (in basso)

43.2. La tubercolosi



La tubercolosi ha una lunga storia

Era presente già in periodi pre-storici

Ha lasciato il suo segno indelebile sulle attività umane creative, musicali, artistiche e letterarie

Ha segnato l'avanzamento delle scienze biomediche e della cura della salute

Il suo agente eziologico, il *Mycobacterium tuberculosis*, nelle sue varie specie e sottospecie si è co-evoluto con il genere umano e la sua presenza è stata osservata in gran parte delle popolazioni antiche e moderne

Il *M. tuberculosis* ha probabilmente ucciso più esseri umani di tutti gli altri patogeni (Daniel 2006)

La tubercolosi è stata oggetto di campagne intensissime di lotta, che hanno visto la sua prevalenza scemare nelle società ad elevato tenore socio-economico

Ma la tubercolosi non è stata vinta, è ancora presente e sta presentando aspetti di resistenza ai farmaci che la rendono un problema sanitario primario



Figura 43.2.
Simbolo della
lotta alla
tubercolosi
sino agli anni
'70 del secolo
scorso

Epidemiologia



La tubercolosi rappresenta una minaccia globale (i dati seguenti si riferiscono al 2009 e sono stati pubblicati nel 2010 dal WHO, *World Health Organization*):

- 2,000 milioni infetti - 13.7 milioni di ammalati
- 9.4 milioni di nuovi casi
- 1.7 milioni di morti



AIDS e tubercolosi, una *liaison* pericolosa

- >1.37 milioni di co-infettati
- >0.38 milioni di morti aggiuntive



Misure di controllo

● chemioterapia:

- funziona, ma con problemi
- sta aumentando l'incidenza di **tubercolosi MDR** (*multi drug resistance*)
> 0.5 milioni di infetti con tubercolosi MDR. (l'aumento dei costi della terapia di una infezione MDR è di 100 volte)
- sta comparando la forma di **tubercolosi XDR** (*extensively drug resistance*), caratterizzata da inefficacia della terapia sia con farmaci di prima scelta che con farmaci di seconda scelta: è frequentemente letale

● vaccinazione:

- i vaccini sino ad ora sperimentati non hanno dato risultati soddisfacenti, in particolare in aree a basso sviluppo socio-sanitario, dove la tubercolosi è maggiormente prevalente e dove sarebbero più utili
- sono in via di valutazione nuovi approcci

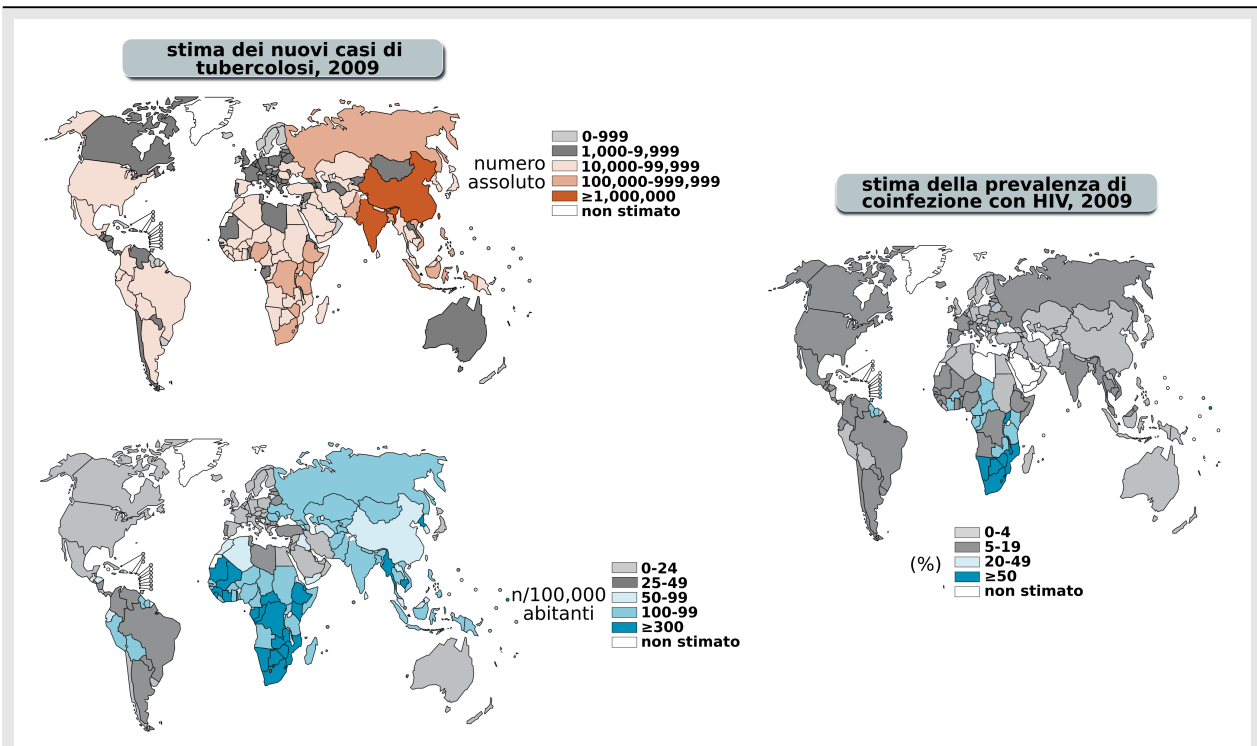


Figura 43.3. Variazione dell'incidenza della tubercolosi in Africa in rapporto con l'infezione concomitante con HIV. Dati da World Health Organization (2010)

43.2.1. SERBATOIO D'INFEZIONE



I pazienti a rischio di trasmettere l'infezione tubercolare (contagiosi) sono quelli con tubercolosi **aperta**

Si parla di tubercolosi aperta quando il paziente emette nell'ambiente bacilli BAAR (bacilli alcool-acido resistenti)

- i pazienti più contagiosi sono quelli con malattia polmonare cavernosa
- i pazienti positivi all'esame culturale, ma con striscio dello sputo negativo, sono scarsamente contagiosi
- i pazienti con tubercolosi polmonare, esame culturale negativo o con tubercolosi extra-polmonare sono essenzialmente non contagiosi
- i pazienti co-infettati con HIV (*human immunodeficiency virus*) avendo una reazione cavitaria polmonare ridotta sono generalmente meno contagiosi dei pazienti non co-infettati

43.2.2. VIE DI TRASMISSIONE



Il *M. tuberculosis* viene comunemente trasmesso da una persona con tubercolosi aperta tramite nuclei infettivi sotto forma di aerosol che si formano durante la tosse, gli starnuti, od anche il semplice parlare

- si possono emettere sino a 3,000 nuclei infettivi per singolo colpo di tosse
- le gocce di aerosol si seccano rapidamente
- le gocce più piccole (<5-10 µm di diametro) possono rimanere sospese nell'aria per ore e possono raggiungere le vie aeree inferiori

Altre vie di trasmissione sono rare anche se possibili (vedi la via alimentare per il *M. bovis* e la via cutanea per il *M. marinum*)



Il rischio di contrarre la malattia **tubercolosi** è legato a fattori estrinseci come la presenza ambientale di aerosol infettanti, la frequenza di locali male aerati ed affollati, etc.

A causa del ritardo che si osserva normalmente nel fare diagnosi e nel ricorrere alla cura, si stima che prima che un caso indice venga confermato, siano state infettate almeno altre 20 persone

43.3. Patogenesi

43.3.1. PREDISPOSIZIONE GENETICA

-  Fattori genetici giocano un ruolo importante nell'immunità innata non adattativa al *M. tuberculosis*. Questa resistenza è di natura poligenica ed è alla base della diversa suscettibilità alla tubercolosi da parte di diverse popolazioni.
- es: è stato individuato il gene *Nramp1* come determinante nella suscettibilità all'infezione nelle popolazioni dell'Africa occidentale.
- Polimorfismi in geni multipli sono associati statisticamente con diversi gradi di suscettibilità.

43.3.2. DALL'INFEZIONE ALLA MALATTIA

-  Il rischio di sviluppare tubercolosi franca dopo essere stati contagiati dipende largamente da fattori endogeni. In particolare dal livello di:
- difese individuali innate non immunologiche ed immunologiche
 - funzione dell'immunità cellulo-mediata
-  Sono molte le condizioni cliniche che favoriscono l'insorgenza della tubercolosi. C'è una buona correlazione tra efficienza del sistema immunitario e rischio di sviluppare la tubercolosi. Il fattore di rischio principale è la co-infezione con HIV dovuta alla carenza di linfociti T CD4⁺.

43.3.3. INFEZIONE PRIMARIA

-  La malattia clinicamente evidente che fa seguito alla prima infezione con *M. tuberculosis* viene chiamata **tubercolosi primaria**.
- La tubercolosi primaria è più comune tra i bambini e tra gli adulti immuno-compromessi.
- La tubercolosi primaria può essere:
- raramente severa e disseminata
 - generalmente asintomatica

Evoluzione dell'infezione primaria

-  Alla prima infezione si forma il **complesso primario di Ranke** costituito dal focolaio primario di infezione (generalmente polmonare, **nodulo di Gohn**), linfangite e linfo-adenite loco-regionale.
- L'infezione primaria dà luogo:
- ad una guarigione clinica ma non biologica (90-95% dei casi): rimangono, in assenza di segni e sintomi di malattia, dei bacilli silenti
 - ad una **tubercolosi primaria progressiva**
-  La tubercolosi primaria progressiva può evolvere in vari modi:
- estensione del complesso primario con massiva caseificazione e colliquazione del focolaio di Gohn e/o dei linfonodi loco-regionali
 - disseminazione per via linfo-ematogena a cui segue una **tubercolosi miliare polmonare** o un **tubercolosi miliare sistemica** (miliare dall'aspetto delle lesioni osservate al tavolo autoptico, moltissime e delle dimensioni di grani di miglio)

43.3.4. TUBERCOLOSI SECONDARIA

- In caso di guarigione clinica ma non biologica esiste la possibilità di sviluppare una tubercolosi secondaria anche dopo molti anni per riattivazione endogena (senza nuovo contagio)
- La re-infezione dovuta ad un nuovo contagio di un individuo già precedentemente infettato può essere una causa di sviluppo della tubercolosi secondaria, specialmente in condizioni socio-sanitarie contraddistinte da un elevato rischio di contagio

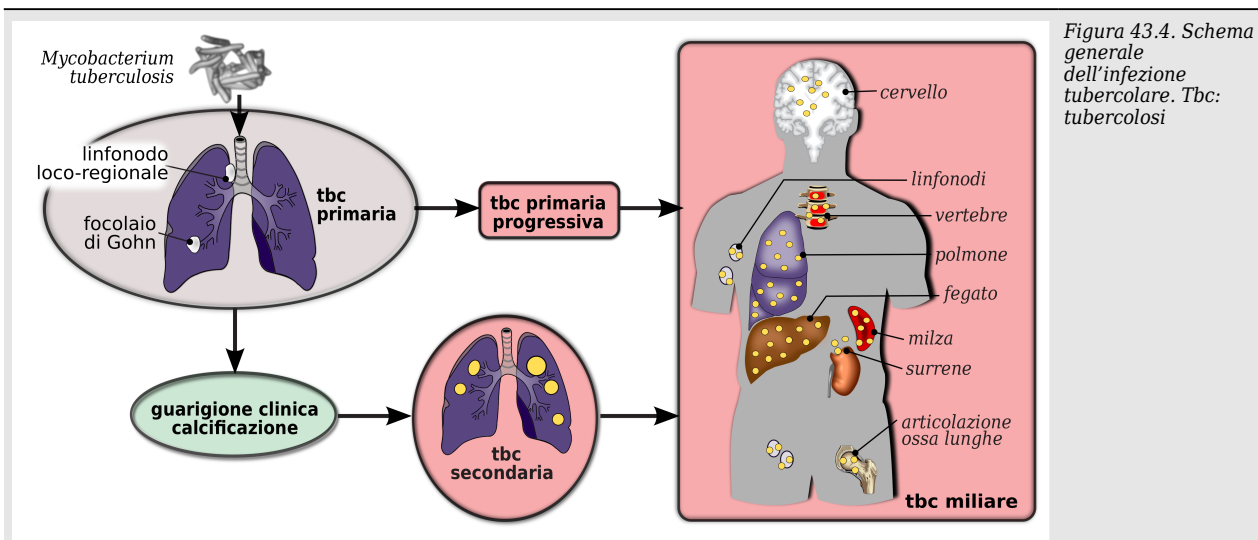


La tubercolosi secondaria può essere:

- diffusa (tubercolosi miliare)
- sistemica (gli organi più colpiti sono oltre al polmone: osso, rene, surrene, cute, tratto digerente, organi sessuali femminili, meningi)
- d'organo (limitata ad un singolo organo)



La tubercolosi secondaria ha una evoluzione clinica simile a quella della tubercolosi primaria progressiva

43.3.5. EVOLUZIONE DELLA MALATTIA TUBERCOLARE

Evoluzione morfologica in caso di guarigione clinica:



- fibrosi nel sito della lesione parenchimale polmonare
- eventuale linfangio-sclerosi
- fibrosi dei linfonodi loco-regionali con eventuale calcificazione

43.3.6. STORIA NATURALE DELLA MALATTIA

- ➡ Studi storici condotti prima dell'avvento della chemioterapia indicano che la tubercolosi non trattata è generalmente letale
- un terzo dei pazienti moriva entro un anno dalla diagnosi
 - la metà dei pazienti moriva entro 5 anni
 - tra i sopravvissuti oltre i 5 anni due terzi andavano incontro a remissione e non erano più infettivi, mentre il rimanente terzo continuava ad essere contagioso
- ➡ Con l'avvento della chemioterapia la prospettiva generale è quella della cura (guarigione clinica e biologica)
- Le eccezioni (frequentissime) sono:
- immuno-depressione
 - infezione con ceppi farmaco-resistenti (in forte crescita)

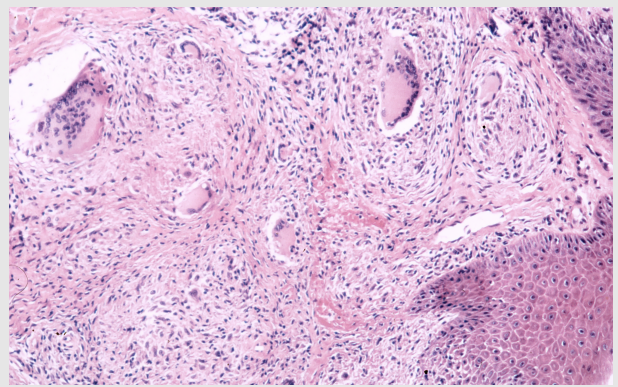


Figura 43.5. Tubercolosi cutanea (lupus tuberculare)
Da: collezione Eugenio Bonetti, Istituto di Patologia generale, Università di Bologna

43.4. Patogenesi e sistema immunitario

43.4.1. INFEZIONE E COLONIZZAZIONE DEI MACROFAGI

- ➡ L'interazione del *M. tuberculosis* con l'ospite umano inizia con l'inalazione di goccioline contenenti i micobatteri
- la maggior parte dei micobatteri inalati rimane intrappolata nelle vie aeree superiori nello strato di muco e viene espulsa dal movimento ciliare, solo una frazione (<10%) raggiunge gli alveoli
- ➡ Negli alveoli i macrofagi alveolari (non ancora attivati) fagocitano i bacilli
- L'ingresso dei bacilli nei macrofagi viene indotto dal legame non specifico della cellula batterica con svariate diverse molecole della superficie cellulare
- ➡ Quando si forma il fagosoma, la sopravvivenza del micobatterio al suo interno dipende primariamente da ridotta acidificazione
- la ridotta acidificazione è dovuta al mancato accumulo di proton-adenosina-trifosfatasi (enzima che pompa protoni all'interno del fagosoma)
- ➡ Si genera una serie di eventi innescati dalla componente della parete **lipo-arabino-mannano** (LAM), eventi protettivi per i micobatteri
- LAM inibisce l'aumento di Ca^{2+} intra-cellulare
 - la via Ca^{2+} /calmodulina (che conduce alla fusione del fagosoma con i lisosomi) viene bloccata
 - i bacilli sopravvivono nei fagosomi
 - i bacilli iniziano a replicarsi nei fagosomi
- ➡ I macrofagi carichi di micobatteri vanno incontro a lisi e rilasciano la progenie di micobatteri

43.4.2. VIRULENZA DEI BACILLI TUBERCOLARI

 Sono stati identificati alcuni geni in grado di:

- conferire virulenza al *M. tuberculosis*
- conferire resistenza agli antibiotici

I principali geni sino ad ora identificati sono:

- gene *katG*: codifica per enzimi catalasi/perossidasi che proteggono contro lo stress ossidativo
 - gene *rpoV*: inizia la trascrizione di molti geni implicati con la virulenza
 - gene *erp A* codifica per una proteina richiesta per la moltiplicazione batterica
 - gene della resistenza alla rifampicina
-

43.4.3. RESISTENZA INNATA ALL'INFEZIONE

 Fattori genetici dell'ospite giocano un ruolo chiave nella resistenza innata non immune all'infezione con *M. tuberculosis*

- gene *Nramp1* (*natural resistance-associated macrophage protein 1*) gioca un ruolo regolatorio nella resistenza/suscettibilità ai micobatteri tra le popolazioni dell'Africa occidentale
 - polimorfismi per HLA (*histocompatibility leukocyte antigen*), IFN- γ (interferone γ), TGF- β (*T cell growth factor* β), IL-10 (interleuchina-10), MBP (*mannose-binding protein*), IFN- γ R (recettore per IFN- γ), TLR-2 (*Toll-like receptor-2*), recettore per la vitamina D, e IL-1, sono stati variamente associati con aumentata suscettibilità allo sviluppo di tubercolosi
-

43.4.4. LA RISPOSTA DELL'OSPITE

 Nello stadio iniziale dell'interazione ospite batterio si possono verificare due situazioni

- si ha la fusione tra fagosomi e lisosomi: i bacilli non sopravvivono
- la fusione non avviene in maniera efficace: i bacilli iniziano a moltiplicarsi e la cellula infetta finisce con andare incontro a lisi

Iniziano quindi le risposte immuni umorale e cellulo-mediata

Questi stadi iniziali dell'infezione sono di norma asintomatici

43.4.5. ATTIVAZIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

 Con la lisi cellulare una serie di mediatori chimici vengono rilasciati, tra cui:

- componenti del complemento
- molecole di origine batterica
- citochine

I mediatori reclutano ulteriori macrofagi di derivazione monocitaria (incluse cellule dendritiche)

Dopo la fagocitosi di prodotti micobatterici i macrofagi migrano nei linfonodi e presentano gli antigeni micobatterici ai linfociti T

43.4.6. LA RISPOSTA IMMUNITARIA NELLA TUBERCOLOSI

- ☞ Dopo 2-4 settimane dall'infezione, si sviluppano due risposte immunitarie verso il *M. tuberculosis*:
- una risposta cellulo-mediata che porta alla attivazione dei macrofagi
 - una risposta che conduce a lesione tissutale
- ☞ La risposta di **attivazione macrofagica** è dovuta ai linfociti T che attraverso il rilascio di citochine attivano i macrofagi
- i macrofagi attivati acquistano una maggiore capacità di uccisione e degradazione dei micobatteri
- ☞ La risposta con lesione tissutale porta a una **reazione DTH** (*delayed-type hypersensitivity*, ipersensibilità ritardata) verso componenti batterici
- Questa risposta
- distrugge i macrofagi non attivati che contengono i micobatteri in moltiplicazione
 - causa necrosi dei tessuti coinvolti
- ☞ Benché entrambe queste risposte possano inibire la crescita dei micobatteri, il tipo di tubercolosi che si produrrà dipende dal loro bilanciamento

43.4.7. LA FORMAZIONE DEI GRANULOMI: I TUBERCOLI

- ☞ Con lo sviluppo dell'immunità adattativa e l'accumulo di macrofagi attivati nel sito di lesione primaria, si formano granulomi: i **tubercoli**
- I tubercoli sono formati da accumuli di linfociti e macrofagi attivati
- I macrofagi attivati evolvono verso la formazione di cellule giganti e cellule epitelioidee (cellule così chiamate perché il loro essere molto vicine tra loro conferisce un aspetto istologico simil-epiteliale)
- La risposta granulomatosa può limitare la crescita dei micobatteri

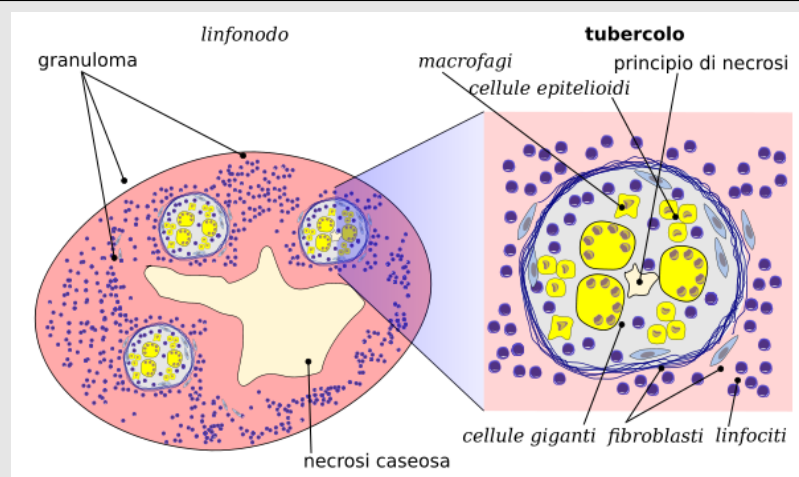


Figura 43.6. Schema generale dell'infezione tubercolare in un linfonodo

- La risposta granulomatosa distrugge i macrofagi e produce a volte necrosi all'interno del tubercolo
- Il *M. tuberculosis* può sopravvivere nel granuloma tubercolare, anche se la sua crescita è rallentata nell'ambiente necrotico ed in presenza di bassa tensione di ossigeno
- Le lesioni possono alla stesso tempo:
- risolversi evolvendo in fibrosi con l'eventuale calcificazione delle zone di necrosi
 - mantenere lo stato infiammatorio e presentare una necrosi in espansione

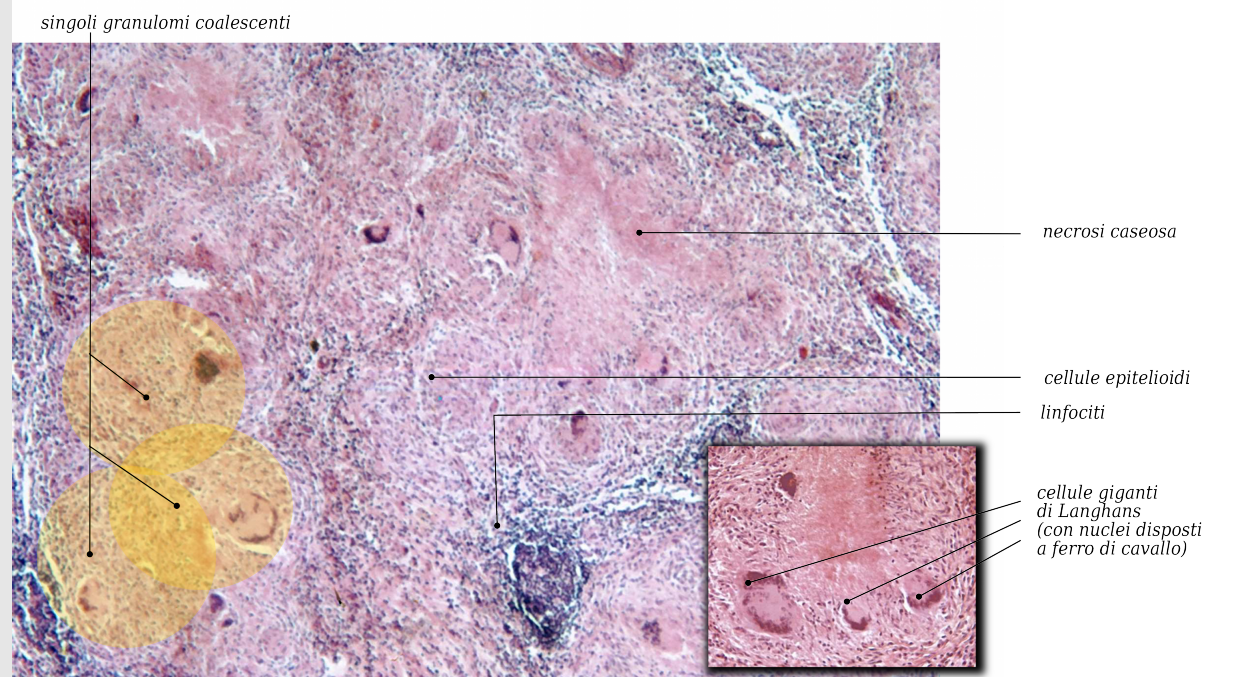
Granuloma tubercolare

Figura 43.7. Tuberculosis linfonodale. Da: collezione Eugenio Bonetti, Istituto di Patologia generale dell'Università di Bologna

43.4.8. LA RISPOSTA DI ATTIVAZIONE MACROFAGICA

La risposta cellulo-mediata è critica negli stadi iniziali della tubercolosi

Nella maggior parte dei pazienti infetti i macrofagi locali vengono attivati quando gli antigeni micobatterici processati dai macrofagi stimolano i linfociti T al rilascio di numerose citochine

I macrofagi attivati si accumulano attorno al centro della lesione e neutralizzano efficacemente i bacilli tubercolari senza causare ulteriore distruzione tissutale

Nella parte centrale della lesione il materiale necrotico presente ha l'aspetto macroscopico simile a ricotta, da cui il nome di necrosi caseosa



Anche quando la lesione va incontro a riparazione/guarigione, bacilli vitali possono rimanere silenti all'interno dei macrofagi o nel materiale necrotico stesso per molti anni

Queste lesioni con guarigione clinica ma non biologica presenti nel parenchima polmonare o nei linfonodi possono andare incontro a calcificazione

43.4.9. LA REAZIONE DI IPERSENSIBILITÀ RITARDATA

In una minoranza di casi la risposta di attivazione macrofagica è debole, e la crescita dei micobatteri può essere bloccata solo da una reazione di ipersensibilità ritardata intensa, che

- porta ad una vasta distruzione tissutale polmonare
- queste lesioni tendono ad allargarsi progressivamente coinvolgendo il tessuto adiacente
- al centro della lesione il materiale necrotico caseoso si liquefa
- vengono invase le pareti bronchiali ed i vasi ematici che vengono distrutti con la formazione di caverne

Diffusione esterna

-  Il materiale liquefatto, contenente un elevato numero di bacilli vitali raggiunge le vie aeree e viene riversato nell'ambiente attraverso la tosse od il parlare
-

Diffusione interna

-  Negli stadi precoci dell'infezione i bacilli vengono trasportati dai macrofagi ai linfonodi da dove essi hanno accesso al torrente ematico disseminandosi così in tutto il corpo
- Le lesioni diffuse seguono la stessa storia naturale di quelle primarie polmonari
- Nei bambini con una immunità naturale scarsa, la disseminazione ematogena può esitare in tubercolosi miliare o meningite tubercolare, spesso fatali
-

43.4.10. RUOLO DEI MONOCITI/MACROFAGI

-  L'immunità cellulo-mediata gioca un ruolo centrale nella risposta difensiva contro il *M. tuberculosis*
- Il ruolo dell'immunità umorale è incerto e probabilmente marginale
- es.: anticorpi anti LAM potrebbero prevenire la disseminazione dei micobatteri nei bambini
-
-  Nell'immunità cellulo-mediata due tipi di cellule sono essenziali:
- macrofagi che fagocitano direttamente i bacilli tubercolari
 - linfociti T che inducono protezione attraverso la produzione di citochine, in particolare IFN- γ
-
-  Dopo l'infezione con *M. tuberculosis* i macrofagi alveolari secernono diverse citochine che sono responsabili di
- eventi localizzati (es.: la formazione dei granulomi)
 - effetti sistemici (es.: febbre e perdita di peso)
-
-  Monociti e macrofagi accumulati nel sito di infezione rappresentano componenti chiave nella risposta immunitaria
- Il meccanismo principale è probabilmente la produzione di NO che ha
- attività anti-micobatterica diretta
 - aumenta la sintesi di citochine (es.: *tumour necrosis factor- α* , TNF- α , e interleuchina-1, IL-1) che a loro volta regolano il rilascio di composti reattivi dell'azoto
- Inoltre i macrofagi possono andare incontro a apoptosi, un meccanismo difensivo che previene il rilascio di citochine e bacilli, che rimangono intrappolati nei corpi apoptotici
-

43.4.11. RUOLO DEI LINFOCITI T



I macrofagi alveolari, i monociti e le cellule dendritiche rappresentano la chiave della processazione e della presentazione degli antigeni micobatterici ai linfociti T CD4⁺ e T CD8⁺

Ne risulta l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T CD4⁺, cardini delle difese immunitarie contro il *M. tuberculosis*

Deficit quantitativi e qualitativi nella risposta CD4⁺ stanno alla base della elevatissima suscettibilità dei soggetti HIV-positivi ai micobatteri

I linfociti T CD4⁺ attivati si differenziano in linfociti produttori di citochine T_H1 o T_H2

- i linfociti T_H1 producono IFN- γ , un attivatore di macrofagi e monociti
- i linfociti T_H2 producono IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e promuovono la risposta umorale
- l'interazione e regolazione reciproca tra le citochine determina la qualità della risposta dell'ospite

43.4.12. COMPONENTI LIPIDICHE E PROTEICHE DEI MICOBATTERI



Composti micobatterici lipidici e proteici sono coinvolti nel riconoscimento da parte del sistema immunitario

Il *M. tuberculosis* presenta diversi antigeni proteici:

- alcuni antigeni sono presenti nel citoplasma e nella parete cellulare altri vengono secreti
- gli antigeni secreti sono i più importanti nel determinare la risposta dei linfociti T
- l'immunità protettiva è il risultato di reattività verso svariati antigeni micobatterici

43.5. Diagnosi microbiologica



La chiave per una diagnosi rapida di tubercolosi è il **sospetto diagnostico**

Si parla di sospetto diagnostico perché la diagnosi non sempre è evidente

Spesso la diagnosi di tubercolosi viene ipotizzata in presenza di un quadro radiologico anomalo in un paziente con sintomi respiratori

- in pazienti immuno-competenti sono presenti lesioni tipiche del lobo superiore maggiore è l'intervallo di tempo tra infezione e diagnosi maggiore è la probabilità di evidenziare la presenza di caverne tubercolari nel polmone
- in pazienti immuno-compromessi si hanno spesso quadri atipici dovuti alla deficiente immunità cellulo-mediata

43.5.1. RICERCA MICROSCOPICA DI BACILLI ACIDO/ALCOOL RESISTENTI (BAAR)

Una diagnosi presuntiva si basa comunemente sul reperto di bacilli alcool-acido resistenti (BAAR) all'esame microscopico di uno striscio di materiale biologico

Esame microscopico BAAR: aspetti positivi

- rapido
- economico
- non-invasivo

Esame microscopico BAAR: aspetti negativi

- sensibilità bassa (40-60%)
- specificità bassa (esistono BAAR non correlati con la tubercolosi)

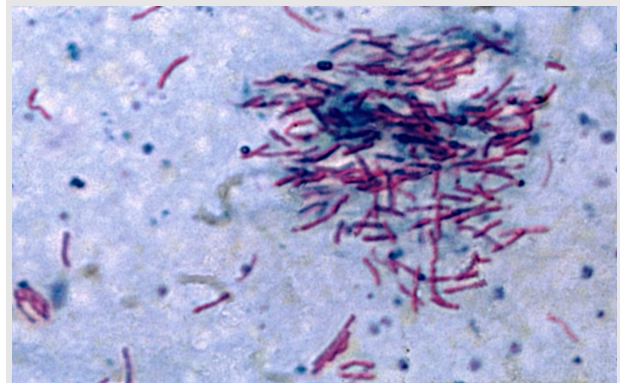


Figura 43.8. Cellule batteriche di *Mycobacterium tuberculosis* in sedimento urinario evidenziate con la colorazione di Ziehl-Neelsen per la alcool-acido resistenza. Questa colorazione è dovuta alla proprietà dei micobatteri di ritenere il colorante dopo trattamento con acido o alcool. Ingrandimento 100×

Dalla collezione Eugenio Bonetti, Istituto di Patologia generale dell'Università di Bologna

La presenza di BAAR (possibilmente confermata dalla positività ad un test di amplificazione degli acidi nucleici specifici) insieme ai segni clinici fornisce una ragionevole sicurezza diagnostica che consente di iniziare una terapia antibiotica prima del risultato dell'esame culturale che, per la lentezza di crescita dei micobatteri, può richiedere un tempo molto lungo, misurabile in settimane per il *M. tuberculosis complex*, e a volte in mesi per altri micobatteri atipici

43.5.2. ESAME CULTURALE

La diagnosi definitiva dipende

- dall'isolamento e dall'identificazione del *M. tuberculosis* in un campione biologico

Poiché la maggior parte delle specie di micobatteri ha una crescita lenta occorrono da 1 a 8 settimane prima di osservare la crescita di colonie

Il *M. tuberculosis* può essere solo presuntivamente identificato sulla base delle caratteristiche di crescita, aspetto e colore della colonia

La genotipizzazione ci consente di avere una identificazione precisa e rapida

Test di suscettibilità ai farmaci

Le colture di *M. tuberculosis complex* isolate dai campioni biologici devono essere saggiate per la sensibilità ai farmaci di primo livello (SIRE-P):

- streptomicina
- isoniazide
- rifampicina
- etambutolo
- pirazinamide

Per gli altri micobatteri l'eventuale antibiogramma è effettuato solo da centri di riferimento nazionali

Nel caso di resistenza ad uno o più dei farmaci sopradetti si effettua un antibiogramma che includa i farmaci di secondo livello

I tempi necessari per la risposta all'antibiogramma sono di circa 3 settimane

43.5.3. TEST ALLA TUBERCOLINA (TST, TUBERCULIN SKIN TEST)



Nel 1891 Robert Koch scoprì che componenti del *M. tuberculosis* presenti in liquido di coltura concentrato (vecchia tubercolina) erano in grado di suscitare una risposta cutanea se iniettati sotto cute a pazienti con tubercolosi

I prodotti vennero poi parzialmente purificati per un uso più standardizzato: PPD (*protein purified derivative*)

I limiti maggiori del PPD sono rappresentati da:

- mancanza di specificità per le varie specie di micobatteri
- inconsistenza tra *batch* e *batch* di prodotto
- interpretazione soggettiva della reazione cutanea

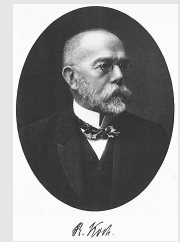


Figura 43.9.
Robert Koch.

Immagine di public domain



Il test cutaneo con la tubercolina viene usato diffusamente nello *screening* per infezioni latenti

Il saggio però ha un valore limitato nel caso di tubercolosi attiva in quanto:

- sensibilità bassa
- specificità limitata
- falsi negativi in caso di tubercolosi avanzata
- falsi negativi in caso di immuno-depressione
- falsi positivi per infezioni con micobatteri non tubercolari
- falsi positivi per precedente vaccinazione

Meccanismo della reazione alla tubercolina (reazione di Mantoux)



Contemporaneamente allo stabilirsi di immunità contro il *M. tuberculosis*, compare uno stato di ipersensibilità ritardata a prodotti micobatterici

Questa reattività è alla base del test cutaneo alla tubercolina (TST, *tuberculin skin test*)

Il TST viene praticato per l'individuazione di tubercolosi in pazienti senza sintomi

Il meccanismo cellulare alla base del TST è legato ai linfociti CD4⁺ sensibilizzati che si accumulano nel sito cutaneo dove è stato introdotto l'antigene, e proliferano producendo citochine



Se il test risulta negativo vale una delle seguenti:

- il soggetto non è mai entrato in contatto con il *M. tuberculosis*
- il soggetto è immuno-depresso: potrebbe non essere mai entrato in contatto con *M. tuberculosis* o potrebbe avere una infezione da latente ad attiva
- il soggetto è nella fase terminale della tubercolosi: paralisi immunitaria (si tratta della negativizzazione di un test in passato positivo)



Se il test risulta positivo

- il soggetto è stato immunizzato in passato
- il soggetto ha una tubercolosi in atto (specie a seguito di una positivizzazione di un test precedentemente negativo o ingravescente)
- il soggetto è stato in passato infettato con *M. tuberculosis* (anche con malattia clinicamente silente) con guarigione clinica ma non biologica; permangono rischi di re-infezione

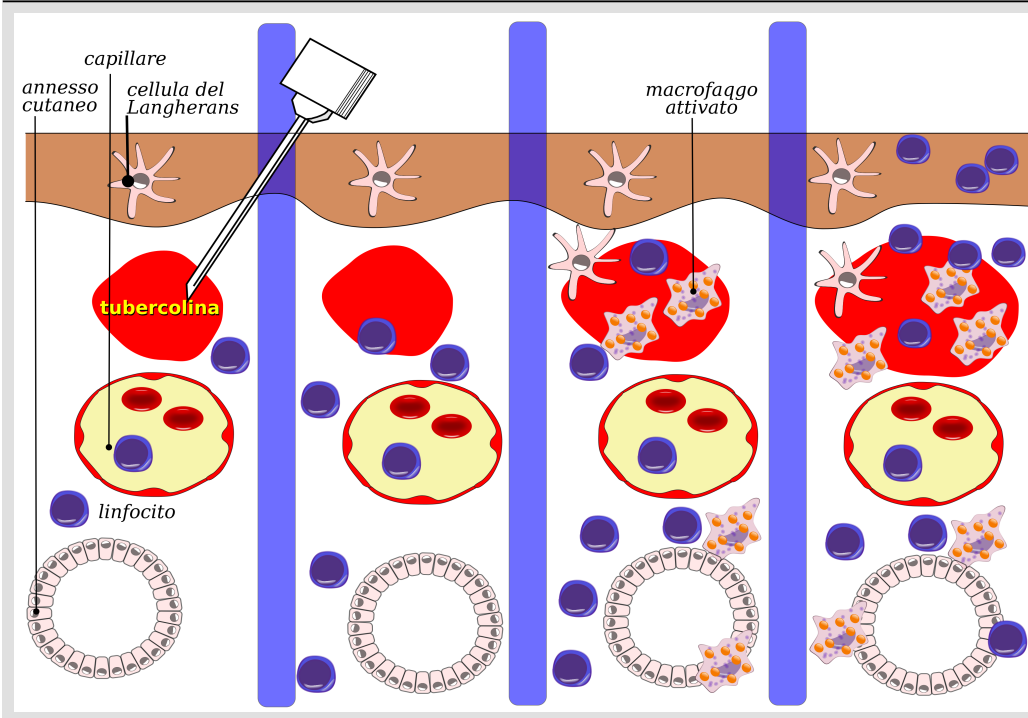
Intra-dermo reazione di Mantoux

Figura 43.10.
Ipersensibilità di tipo tubercolinico

Dopo 12 ore dall'iniezione intra-dermica di tuberculina i linfociti iniziano a migrare dai vasi ematici locali e si accumulano intorno agli annessi cutanei

Dopo 48 ore compaiono i macrofagi e le cellule del Langherans migrano dall'epidermide al derma

Il traffico cellulare persiste anche nelle successive 24 ore, e sui cheratinociti compaiono le molecole di classe II

Da questo momento si innesca la flogosi
Liberamente tratto da Roitt (1993)

43.5.4. AMPLIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Esistono alcuni saggi diagnostici per la tubercolosi basati sull'amplificazione di acidi nucleici sia da campione che da brodo/terreno di coltura

- permettono una diagnosi in tempi molto ristretti (meno di un giorno)
- hanno una sensibilità e specificità di poco inferiore a quella dell'esame colturale
- trovano la massima utilità nel confermare la diagnosi in caso di test microscopico positivo per BAAR
- possono essere usati anche nella tubercolosi polmonare BAAR-negativa o tubercolosi extra-polmonare
- possono essere utilizzati nella diagnosi di tubercolosi latente

Saggi per il rilascio di IFN- γ (IFN- γ release assay, IGRA)

Sono disponibili comunemente due saggi *in vitro* che misurano il rilascio di IFN- γ (IFN- γ release assay, IGRA) in risposta alla stimolazione con gli antigeni altamente specifici per la tubercolosi ESAT-6 e CFP-10

- QuantiFERON-TB Gold® (Cellestis Ltd., Carnegie, Australia): è un saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) per la misurazione di IFN- γ
- T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec, Oxford, UK) utilizza la procedura ELISpot (enzyme-linked immunospot assay)



Altri potenziali vantaggi dei saggi IGRA includono

- vantaggi logistici (meno interventi diretti sul paziente)
- abolizione di valutazioni soggettive sull'aspetto della lesione cutanea indotta dal test cutaneo
- possibilità di ripetere l'esame senza correre il rischio di indurre una amplificazione della risposta dovuta all'effetto immunogeno della tuberculina (la intra-dermo reazione di Mantoux può essere ripetuta solo a distanza di 6 mesi)

43.6. Procedure per la diagnosi microbiologica

43.6.1. RICHIESTA



- La ricerca di micobatteri deve essere richiesta espressamente ed accompagnata dal sospetto clinico
- La bassa sensibilità e specificità (altri microrganismi sono BAAR) dell'esame microscopico impongono il costante abbinamento con l'esame colturale
- Nella richiesta devono essere segnalati il tipo di campione biologico, la sede del prelievo ed il recapito telefonico del richiedente

43.6.2. RACCOLTA DEI CAMPIONI



- Raccogliere il materiale in contenitori sterili con tappo a vite e privi di conservante o fissativi. È consigliata l'aggiunta di pochi mL di soluzione fisiologica sterile per evitare l'essiccamento dei materiali biotici e del materiale prelevato con tampone (procedura quest'ultima sconsigliata)
- Rispettare il volume:

● campioni respiratori	>5 mL
● urina della prima minzione	>50 mL
● feci	1 g
● liquidi cavitari	10-15 mL
● liquor	>2-3 mL

43.6.3. CONSERVAZIONE ED INVIO



- I campioni devono essere inviati al più presto e comunque entro 24 ore dal prelievo
- I campioni vanno conservati a 4-8°C. Fanno eccezione le emo-culture che devono essere conservate a temperatura ambiente
- L'aspirato gastrico deve essere neutralizzato al momento del prelievo aggiungendo carbonato di sodio

43.6.4. PROCESSAZIONE (IN LABORATORIO)



- Campioni contaminati da flora residente (feci, urine, campioni respiratori, etc.) necessitano di decontaminazione, omogenizzazione, e concentrazione
- I campioni respiratori devono essere fluidificati
- I campioni privi di flora residente (definiti a volte "sterili") (liquido cefalo-rachidiano, sangue, urina da puntura sovra-pubica, aspirato midollare) possono essere solo concentrati

43.6.5. REFERTO



- Esame microscopico: referto entro 24 h dalla presa in carico del campione con segnalazione telefonica al richiedente e via fax al CIO (comitato infezioni ospedaliere), che a sua volta allerta il Servizio di Igiene Pubblica
- Amplificazione genica da campione biologico: refertato in 24 h
- Esame colturale: segnalazione della positivizzazione delle colture appena si rileva la crescita di BAAR
- Identificazione mediante DNA-probe: 2-3 giorni
- Antibiogramma: circa 10 giorni dalla positivizzazione della coltura

43.7. Terapia antibiotica



La terapia antibiotica è una terapia multi-farmaco per ridurre i rischi di induzione di resistenza

Consta di una serie di farmaci di prima scelta che si utilizzano in varie combinazioni anche a seconda del risultato dell'antibiogramma

Ci si rivolge ai farmaci di seconda scelta solo in caso di conclamata resistenza

● Farmaci di prima scelta (acronimo SIRE-P)

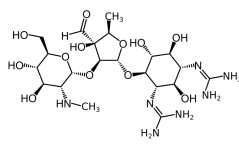
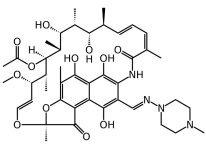
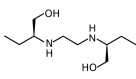
- streptomicina
- isoniazide
- rifampicina
- etambutolo
- pirazinamide

● Farmaci di seconda scelta

- amikacina
- capreomicina
- kanamicina
- fluorochinoloni: ciprofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, ofloxacina

Farmaci di prima scelta: caratteristiche generali

Figura 43.11. Strutture dei principali farmaci anti-tubercolari

				
streptomicina	isoniazide (pro-farmaco)	rifampicina	etanbutolo	pirazinamide pro-farmaco
inibitore della sintesi proteica batterica	blocca la sintesi degli acidi micolici	blocca la sintesi di RNA DNA-dipendente	altera la sintesi della parete batterica	blocca la sintesi degli acidi grassi
battericida	battericida solo per i bacilli in divisione	battericida	batteriostatico	battericida anche su bacilli a bassa attività
effetti collaterali				
oto-tossicità tossicità renale	neuropatia periferica neurite ottica epatite convulsioni	nausea e anoressia interazione con farmaci per induzione enzimatica epato-tossicità colorazione arancio di lacrime, urine, sudore	neurite ottica neurite periferica	epato-tossicità nausea e vomito artralgia anemia sideroblastica iper-uricemia

43.7.1. FARMACO-RESISTENZA



I bacilli *M. tuberculosis complex* sono naturalmente resistenti alla maggioranza dei farmaci anti-batterici

Sono sensibili solo ad un ristretto gruppo di molecole (acronimo SIRE-P)

Negli ultimi anni si è osservata la comparsa di:

- ceppi MDR (*multi drug resistance*, resistenza multipla a farmaci) resistenti a isoniazide e/o rifampicina
- ceppi XDR (*extensive drug resistance*, resistenza estesa ai farmaci) resistenti a rifampicina, isoniazide, ed almeno uno dei farmaci di seconda scelta



Figura 43.12. Comparsa di forme di tubercolosi XDR (extensively drug resistant). **Dati da** World Health Organization

43.8. Lebbra (opzionale)



L'infezione con il *Mycobacterium leprae* mostra forme cliniche diverse e forme intermedie

Lo sviluppo di una forma o dell'altra dipende non da varianti genetiche del microrganismo ma da varianti genetiche dell'ospite che portano ad una diversa risposta con patogenesi del danno e quadri clinici molto diversi tra loro

Tabella 44.80: Quadri clinici delle due forme di lebbra tipiche. Esistono anche forme intermedie

lebbra tubercoloide

microrganismi presenti a livello da basso a non dimostrabile

bassa infettività

granulomi, infiammazione locale

danno ai nervi periferici

livelli di immunoglobuline seriche normali

capacità di risposta normale dei linfociti T

risposta specifica agli antigeni del *M. leprae*

lebbra lepromatosa (classica)

microrganismi mostrano una crescita florida nei macrofagi

⇒ alta infettività

⇒ infezione disseminata

⇒ danni diffusi a ossa, cartilagine, e nervi con distruzione tissutale

⇒ iper-gammaglobulinemia. Le IgG non possono comunque aggredire il *Mycobacterium*

⇒ capacità di risposta dei linfociti T bassa o assente

⇒ nessuna risposta specifica agli antigeni del *M. leprae*



Figura 43.13. Uomo di 24 anni, norvegese ammalato di lebbra lepromatosa. Immagine di public domain

Lebbra: meccanismo immunitario

Tabella 44.81: Distribuzione delle citochine nelle lesioni lepromatose. IL: interleuchina; IFN: interferone

Citochine T _H 1	Forma tubercoloide	Forma lepromatosa	Citochine T _H 2	Forma tubercoloide	Forma lepromatosa
IL-2	■ ■ ■ ■	-	IL-4	■ ■	■ ■ ■ ■ ■
IFN- γ	■ ■	-	IL-5	-	■ ■ ■ ■
Linfotossina	■ ■ ■ ■ ■	■ ■	IL-10	-	■ ■ ■ ■

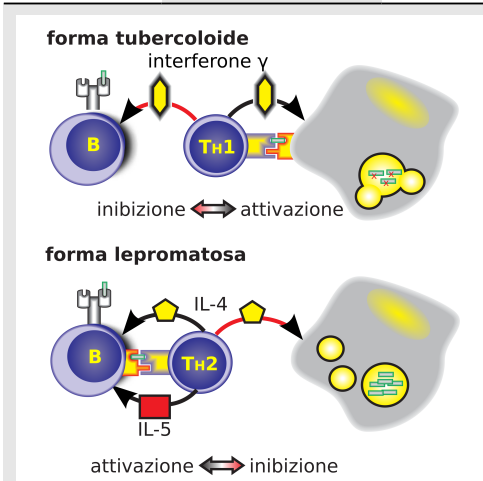


Figura 43.14. Meccanismo immunitario per le due forme di lebbra

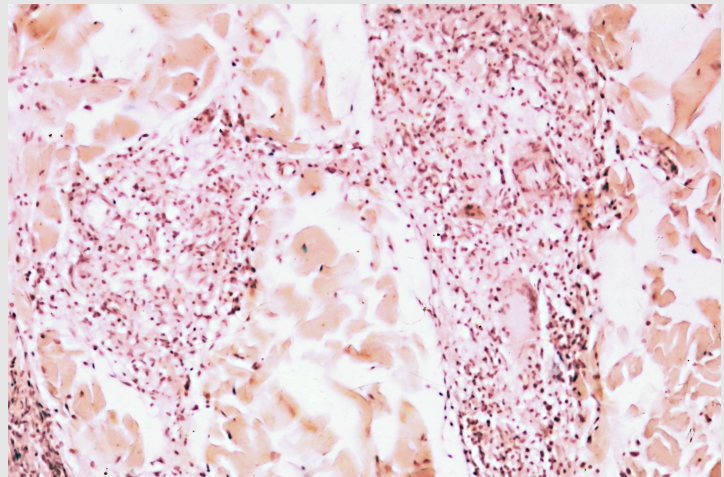


Figura 43.15. Granulomi tipici della lebbra tubercoloide. Dalla collezione Eugenio Bonetti, Istituto di Patologia generale dell'Università di Bologna

Risposte a cellule T e risposte dei macrofagi al *Mycobacterium leprae*

- ☞ Nella lebbra tubercoloide la crescita del microrganismo viene ben controllata dalle cellule T_H1-simili che attivano i macrofagi infetti
La lesione tubercoloide contiene granulomi ed è infiammata, ma la lesione è locale e causa solo effetti locali, come il danno ai nervi periferici
- ☞ Nella lebbra lepromatosa, l'infezione è disseminata, e i bacilli crescono senza controllo nei macrofagi
Negli stadi terminali della malattia sono presenti gravi danni ai tessuti connettivi ed ai nervi periferici

Citochine nella lebbra

- ☞ Il quadro delle citochine nelle due forme di malattia è molto diverso
 - le cellule e le citochine T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-10) dominano nella forma lepromatosa
 - le cellule e le citochine T_H1 (IL-2, IFN- γ e linfotossina) dominano nella forma tubercoloide

Clinica della lebbra

- ☞ Il *M. leprae* non è coltivabile e la diagnosi si basa sul referto microscopico di bacilli nelle lesioni, sulla base del sospetto clinico e anamnestico
La terapia è con coloranti (clofazimina) e sulfamidici (dapsone)

43.9. Principali fonti utilizzate

- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (1999) *Robbins Pathologic basis of disease*. VI ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia
- Daniel, T.M. (2006) *The history of tuberculosis*. *Respir. Med.* 100, 1862-1870
- Janeway, C.A., Travers, O. (1994) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland, New York
- Raviglione, M.C., O'Brian, R.J. (2008) *Tuberculosis*. In: Fauci, A.S., Braunwald, E., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Loscalzo, J. (eds.) *Harrison's principles of internal medicine*. XVII ed. Mc Graw Hill, New York. Pp. 1006-1038
- Palomino, J.C., Cardoso Leao, S., Ritacco, V. (eds.) (2007) *Tuberculosis 2007. Free electronic edition*. Pp 686
- Roitt, I. M., Brostoff, J., Male, D. K. (1993). *Immunology*. III ed. Mosby, Edinburgh
- Rubin, E.J. (2009) *The Granuloma in Tuberculosis — Friend or Foe?* *N. Engl. J. Med.* 360, 2471-2473
- Rubin, R., Farber, J.L. (1994) *Pathology*. II ed. Lippincott, Philadelphia
- Tortoli, E., Piersimoni, C., Scarparo, C., Cirillo, D.M. (2008) *Micobatterologia clinica*. Selecta Medica, Pavia
- World Health Organization (2010) *Global tuberculosis control: WHO report 2010*. WHO press, Geneve

Siti web

phil.cdc.gov/phil/	visitato il 04/07/2011	accessibile il 04/07/2012
health.state.tu.us	visitato il 05/10/2011	non più accessibile il 13/10/2011
theunion.org/scientific-publications	visitato il 13/10/2011	visitato il 04/07/2012
phil.cdc.gov/ziehl-neelsen_stain	visitato il 13/10/2011	visitato il 04/07/2012

