

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO
Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

DIPARTIMENTO
Malattie Infettive

CORSO DI DOTTORATO
Malattie Infettive

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Tubercolosi polmonare, extrapolmonare e disseminata a
confronto: analisi clinica ed epidemiologico molecolare
nell'area urbana di Milano, 1996-2010

L5R

Dott. Fabio Zanini

Dott. Fabio Franzetti

Chia.ma Prof.ssa Antonella d'Arminio Monforte

A.A. 2011/2012

INDICE

1. **TUBERCOLOSI**

1.1. EZIOLOGIA	pag.	4
1.2. EPIDEMIOLOGIA	pag.	9
1.3. PATOGENESI E STORIA NATURALE	pag.	23
1.4. MANIFESTAZIONI CLINICHE	pag.	30
1.5. DIAGNOSI	pag.	42
1.6. TERAPIA	pag.	51
1.7. EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE	pag.	61

2. **STUDIO**

2.1. INTRODUZIONE	pag.	72
2.2. SCOPO DELLO STUDIO	pag.	78
2.3. PAZIENTI E METODI	pag.	78
2.4. RISULTATI	pag.	85
2.5. DISCUSSIONE	pag.	95

3. **BIBLIOGRAFIA**

pag.	99
------	----

1. Tuberculosis

1.1 EZIOLOGIA

I micobatteri sono ubiquitari in natura, in quanto la loro presenza è stata riscontrata nelle acque, nel suolo, negli alimenti e come ospiti di varie specie animali.

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*), individuato per la prima volta da Robert Koch nel 1882, appartiene alla specie *Mycobacterium*, si colloca all'interno della famiglia delle *Mycobacteriaceae* ed appartiene agli Actinobatteri (Tab.1).

Regno	<i>Bacteria</i>
Tipo	<i>Actinobacteria</i>
Classe	<i>Actinobacteridae</i>
Ordine	<i>Actinomycetales</i>
Sottordine	<i>Corynebacterineae</i>
Famiglia	<i>Mycobacteriaceae</i>
Genere	<i>Mycobacterium</i>

Tabella 1 Classificazione tassonomica di *Mycobacterium*

Ad oggi le specie individuate all'interno del genere *Mycobacterium* sono circa 130, ma il numero è in continuo aumento. La classificazione in base agli studi sul genoma micobatterico ha infatti, in alcuni casi, confermato le specie già definite sulla base dei caratteri fenotipici (velocità e temperatura di crescita, pigmentazione delle colonie e i caratteri biochimici e attività metaboliche), mentre in molti casi ha suddiviso le precedenti unità tassonomiche in due o più identità (1).

Il genere *Mycobacterium* è raggruppato in complessi (*complex*) (Tab.2) costituiti dalle specie simili fra loro dal punto di vista biologico e clinico per il tipo di patologia causata. Al *Mycobacterium tuberculosis complex* appartengono tre specie patogene per l'uomo: *M. tuberculosis*, *M. africanum* (isolato prevalentemente in alcune regioni dell'Africa centrale) e *M. bovis* (agente eziologico della tubercolosi bovina, trasmissibile all'uomo per via alimentare mediante l'ingestione di carni o latte proveniente da animali infetti) (2). Una quarta specie, *Mycobacterium microti*, è patogena solo per i roditori (3).

Complessi	Specie
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. bovis BCG</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. pinnipedii</i> , <i>M. canettii</i>
<i>Mycobacterium avium</i> complex	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. chimaera</i> , <i>M. colombiense</i>
<i>Mycobacterium terrae</i> complex	<i>M. terrae</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> , <i>M. arupense</i> , <i>M. hiberniae</i> , <i>M.</i> <i>kumamotoense</i>

Tabella 2 , complessi e specie di Mycobacterium

L'uomo è il suo unico serbatoio. *M. tuberculosis* un aerobio stretto ed, infatti, gli organi più colpiti nelle disseminazioni metastatiche appaiono quelli in cui la pressione parziale di ossigeno è più elevata, quali gli apici polmonari ed i reni.

Presenta un *optimum* di temperatura a 37°C. Il bacillo della tubercolosi si dimostra sensibile al calore, soprattutto umido (in autoclave a 120°C viene ucciso in pochi minuti), ma non al freddo (si mantiene vitale per diversi giorni a +4°C e per alcuni mesi a -75°C); ha notevole resistenza all'essiccamento soprattutto se al riparo dalla luce solare.

Mycobacterium tuberculosis è un bacillo asporigeno, privo di ciglia e di capsula e appare al microscopio come un bastoncello immobile di piccole dimensioni (1-4 x 0.3-0.6 µm) (4).

Estremamente importante per la crescita e la sopravvivenza di *M. tuberculosis* è la parete cellulare. E' molto complessa, ha un elevato spessore (oltre 20 nm) ed è distinta dalla membrana plasmatica a mezzo di uno spazio periplasmatico di circa 10 nm. Più del 30% del suo peso secco è determinato da lipidi. Ha caratteristiche simili a quelle della parete cellulare dei microrganismi appartenenti ai generi *Nocardia* e *Thermomonospora*.

Nella parete cellulare (*cell wall*) si identificano due segmenti, inferiore e superiore.

La porzione inferiore, più interna, è denominata *core* ed è costituita dal complesso micolarabinogalattan-peptidoglicano (mAGP). Si tratta di un peptidoglicano (PG) legato covalentemente ad un galattofurano lineare, a sua volta legato a diverse file di arabinofurani, a loro volta legati agli acidi micolici (5,6,7).

Il PG è caratterizzato dall'alternanza di unità di N-acetilglucosamina (GlcNAc) ad acido muramico modificato. Le catene tetrapeptidiche del PG consistono in L-alanil-D- isoglutaminil-meso-diaminopemeil-D-alanina. Questo tipo di PG è uno dei più comuni nei batteri, ma il PG dei micobatteri differisce poiché alcuni o tutti i residui di acido muramico sono N-acetilati con acido glicolico.

Gli acidi micolici rappresentano le molecole caratteristiche dei micobatteri: sono acidi grassi ramificati in posizione α e con un ossidrilico in posizione β ; hanno grandi dimensioni (70-90 atomi di carbonio). *M. tuberculosis* produce tre tipi di acido micolico, che differiscono soprattutto per la presenza e la natura dei sostituenti contenenti ossigeno nella porzione distale del ramo meromicolato. Gli acidi micolici sono orientati perpendicolarmente al piano della membrana e formano una speciale barriera lipidica responsabile di molti aspetti della fisiologia e della patogenicità di *M. tuberculosis*. Un paradigma centrale dell'immunologia è che le cellule T riconoscono antigeni peptidici presentati nel contesto del complesso maggiore di istocompatibilità. È stato rilevato che una sottoclasse di linfociti T può, invece, riconoscere antigeni non peptidici in presenza di *antigen presenting cells (APC)* che esprimano CD1. Tali linfociti T possono riconoscere gli acidi micolici (8)

La porzione superiore della parete cellulare è invece costituita da lipidi liberi polari ed apolari: sono molecole legate non covalentemente e con un profilo di distribuzione sulla superficie cellulare ceppo dipendente.

Intercalati nell'ambiente lipidico della parete cellulare si possono individuare molecole che sono state oggetto di estese ricerche ed il cui ruolo nello scambio di segnali intercellulari, nella risposta immunitaria e nella patogenesi sta ora emergendo. Si tratta di sulfolipidi (SLs), fattore cordale, lipidi contenenti ftiocerolo dimicocerosato (DMI), fosfatidilinositolomannosidi (PIMs), lipomannano (LM) e lipoarabinomannano (LAM).

Diversi studi hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione tra la presenza di SLs negli isolati di *M. tuberculosis* e la virulenza del microrganismo. I ceppi più virulenti elaborano grandi quantità di lipidi acidi, tra cui SLs, mentre i ceppi attenuati sono privi di questi componenti. Goren ha dimostrato che i sulfolipidi sono implicati nella fusione fagosoma-lisosoma. Il fattore cordale, responsabile della particolare disposizione delle colture di molti ceppi di bacilli tubercolari, è immunogeno e stimola la formazione dei granulomi. Considerando poi il ftiocerolo dimicocerosato (DMI), esso è una cera e rende ragione della denominazione del bacillo tubercolare come "*ball of wax*"; i ceppi di *M. tuberculosis* poveri di DIM presentano una parete cellulare più permeabile. I PIMs sono costituiti da fosfatidilinositolo, che lega a sé da una a sei molecole di mannosio (solitamente due). È stato dimostrato che i lipomannani (LM) ed i lipoarabinomannani (LAM) sono estensioni dei PIMs. Il LAM svolge molte azioni immunomodulanti, contribuendo in questo modo alla patogenesi delle manifestazioni cliniche: blocca diverse funzioni indotte da IFN- γ tra cui l'attività microbica dei macrofagi, inibisce l'attività della protein chinasi C e stimola la produzione di molte citochine associate ai macrofagi come TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 (9).

Nel contesto della parete cellulare è possibile riconoscere anche proteine; alcune di queste rappresentano l'antigene responsabile dell'ipersensibilità di tipo ritardato dimostrabile nei soggetti infettati. Infine, polisaccaridi capsulari tra cui un α -1,4 glucano, un arabinomannano ed un mannano sono stati individuati all'esterno della cellula. A conferma di quanto finora detto possiamo notare che quando la parete cellulare è distrutta, ad esempio per azione di vari solventi, i lipidi liberi, le proteine, il LAM, ed i PIMs sono solubilizzati mentre il complesso mAGP rimane come residuo insolubile. Si può quindi affermare che questi lipidi, proteine e lipoglicani siano delle molecole effettrici mentre il *core* insolubile è essenziale per la vitalità della cellula. La conoscenza delle proprietà della parete cellulare rende ragione di molti aspetti microbiologici e patogenetici di *M. tuberculosis* quali le piccole dimensioni, l'idrofobicità, l'alcol-acido resistenza, la lenta crescita e la resistenza a diversi antibiotici.

Per quanto concerne l'alcol-acido-resistenza, essa è la principale caratteristica tintoriale dei micobatteri e può essere evidenziata con la colorazione di Ziehl- Neelsen. Questa tecnica richiede di trattare il preparato per 2-3 min con una soluzione di fucsina addizionata di acido fenico riscaldando il vetrino fino a che la soluzione del colorante emetta dei vapori visibili, lavare con acqua e decolorare per 30-60 secondi con una soluzione di HCl al 3% in alcol etilico, infine eseguire una colorazione di contrasto con blu di metilene. Solo i micobatteri mantengono il colore rosso della fucsina dopo il trattamento mentre tutti gli altri materiali vengono decolorati e sono ricolorati in blu dalla colorazione di contrasto; i micobatteri sono quindi facilmente apprezzabili come bacilli rossi in campo blu (Fig.1).

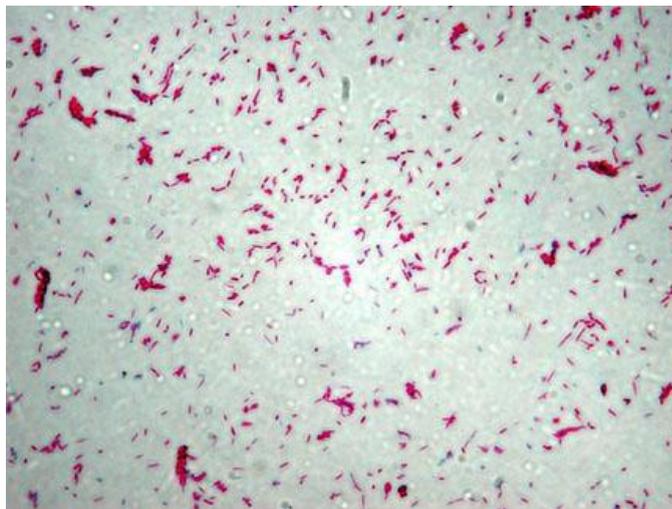


Figura 1 Colonie di *Mycobacterium tuberculosis* visualizzate al microscopio ottico dopo colorazione di Ziehl – Neelsen.

L'acido resistenza è dovuta alla formazione di aryl-metano-micolati tra la fucsina e gli acidi micolici presenti negli involucri cellulari nonché ai complessi che si formano tra il colorante e varie strutture superficiali o intracellulari del batterio e che ancorano saldamente il colorante impedendone l'asportazione da parte del decolorante (alcol-acido).

La parete cellulare, inoltre, conferisce alla cellula un particolare atteggiamento funzionale caratterizzato da lenti scambi metabolici da cui dipende il ridotto ritmo di replicazione (15-20 ore in contrasto con la singola ora sufficiente allo crescita della maggior parte dei batteri): ne deriva che lo sviluppo microbico di una coltura primaria è apprezzabile solo dopo alcune settimane (3-6) di incubazione a 37°C.

Il bacillo di Koch non cresce sui comuni terreni, ma solo su quelli arricchiti con sostanze complesse. Si possono utilizzare terreni a base di tuorlo d'uovo: sono molto sfruttati per l'isolamento primario e sono disponibili in numerose formulazioni. Essi consistono in genere in una miscela di soluzione tampone e giallo d'uovo, fatta coagulare a becco di clarino in provette tenute per qualche tempo a 65-70°C. Questi terreni contengono anche varie concentrazioni di verde malachite per impedire lo sviluppo di specie microbiche sfuggite ai processi di decontaminazione iniziale del prodotto morboso in esame e l'aggiunta di glicerolo (per favorire lo sviluppo di *M. tuberculosis*) o piruvato (per favorire lo sviluppo di *M. bovis*). Tra questi ricordiamo i terreni solidi di Lowenstein-Jensen (uova, sali, glicerolo, patata e verde malachite) e di Petraghani (uova, patata, latte, glicerolo e verde malachite).

Esistono anche terreni a composizione chimica definita: sono costituiti da una soluzione tampone di base arricchita con acido oleico (come sorgente di lipidi), albumina bovina, destrosio e catalasi solidificati con agar o mantenuti allo stato liquido.

Nei terreni liquidi e nel caso di micobatteri virulenti è ben evidente la tendenza a crescere in formazioni cordali formate da numerosi bacilli allineati in lunghe file parallele: questa caratteristica è in funzione delle proprietà idrofobiche della superficie cellulare per l'alto contenuto in lipidi e, in particolare, della presenza di particolari derivati degli acidi micolici denominati appunto fattore cordale (10).

Infine, la comprensione della natura del *cell wall* mette in luce il meccanismo d'azione di alcuni dei più efficaci farmaci antitubercolari. Ad esempio possiamo osservare che isoniazide ed etambutolo inibiscono la sintesi di alcuni componenti della parete, rispettivamente gli acidi micolici e l'arabinano.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

La tubercolosi è una malattia ancestrale che accompagna la storia dell'umanità sin dai suoi albori. I caratteri devastanti della patologia hanno affascinato scrittori e poeti, fino a tramutare questo mito infernale in malattia romantica. La diffusione globale, l'impatto sulla morbilità e sulla mortalità della TB hanno subito radicali mutamenti attraverso i secoli e nelle differenti regioni geografiche (11). Per comprendere l'attuale situazione epidemiologica nel mondo è utile ripercorrere brevemente le tappe del passato.

Sguardo storico

Un tempo si riteneva che *M. tuberculosis* fosse stato trasmesso dall'uomo al bestiame circa 10 000- 15 000 anni fa (12). Recenti lavori suggeriscono che la relazione tra tubercolosi umana e bovina sia stata un'evoluzione parallela più che una trasmissione diretta dai bovini all'uomo.

Campioni ossei con lesioni indicative di infezione tubercolare possono essere datati al Pleistocene (3 milioni- 10 000 anni fa). L'applicazione della biologia molecolare (*Spoligotyping*) su questo *ancient* DNA ha evidenziato un profilo genomico più simile a *M. tuberculosis* che a *M. africanum* o *bovis* (13)

E' dunque possibile stimare che le prime infezioni tubercolari nell'uomo si siano verificate antecedentemente alla formazione dei villaggi.

Circa nel 7000 A.C lo sviluppo dell'agricoltura e dell'allevamento indussero la formazione dei primi villaggi: si determinarono, così, le condizioni perché la tubercolosi divenisse più frequente ed assumesse i caratteri di una patologia endemica nella popolazione.

Rimaneva ancora una malattia rara nelle antiche popolazioni, come dimostrano le scarse testimonianze grafiche. Quando l'uomo si stabilì in comunità più numerose (25.000 persone o più) le nuove condizioni ambientali venute a creare modificarono il delicato equilibrio tra l'uomo ed il bacillo della tubercolosi (14).

Studi paleontologici hanno evidenziato la presenza di lesioni vertebrali tipiche di TB in scheletri di mummie neolitiche (4.000 anni A.C.) egizie (3000 anni A.C.) e peruviane, confermando, peraltro, la presenza di tale malattia nelle Americhe molto prima dell'arrivo dei primi esploratori europei.

La tubercolosi era nota nella cultura greca ed identificata nelle opere di Ippocrate (460 – 370 a.C.) con il nome φθισις, che significa deperimento, consunzione, declino a connotare il carattere devastante della malattia che strappava la vita ai giovani adulti. Alcuni secoli dopo

fu Galeno (131 – 201 d.C.) il primo a sospettare la natura contagiosa della malattia, rifuggendo l'allora più popolare teoria ereditaria della malattia.

Nel medioevo si riteneva che il *"tocco reale"*, l'imposizione delle mani da parte del monarca, potesse guarire dalla scrofula, linfadenite tubercolare, anche denominata, per tale motivo, in Inghilterra *"King's evil"*.

Accadde durante il rinascimento che grandi scienziati, come Laennec, unificarono il concetto della tubercolosi, identificandone una forma polmonare ed una extrapolmonare, e descrissero i principali sintomi e segni clinici.

Il sovraffollamento, la povertà, le scarse condizioni igieniche e sanitarie furono i fattori alla base dello tsunami epidemico che afflisse l'Europa tra il XVII e il XIX secolo, durante il quale il tasso di mortalità raggiunse il 1.000/100.000. Furono colpite dal contagio massivo di tubercolosi soprattutto le grandi città, come Londra, Amburgo e Stoccolma, che, durante la Rivoluzione Industriale, accoglievano flussi di contadini dalle campagne in cerca di lavoro. Successivamente, la malattia dall'Europa occidentale si è diffusa in ugual misura in Europa orientale, Asia, Africa e Sud America. Durante tale diffusione epidemica negli altri continenti la tubercolosi ha causato più morti di qualsiasi altra malattia (15).

Nei primi decenni del XIX secolo si verificò una marcata inversione di tendenza ed il numero delle morti attribuito alla tubercolosi iniziò a diminuire. Questo fenomeno può essere giustificato dal miglioramento delle condizioni abitative e lavorative e dall'applicazione di alcune misure di sanità pubblica, nate dalla considerazione della tubercolosi come una malattia infettiva (ad esempio, isolamento dei malati nei sanatori). La storia della tubercolosi ha subito una svolta epocale il 24 Marzo 1882, giorno in cui Hermann Heirinch Robert Koch presentò la sua scoperta *"sull'eziologia della tubercolosi"*, che gli valse nel 1905 il premio Nobel per la medicina. Egli produsse, attraverso studi microscopici, l'inconfutabile evidenza che la tubercolosi fosse una malattia infettiva provocata da un bacillo, che da quel giorno ha preso il nome di bacillo di Koch.

Diversi tentativi terapeutici precedettero l'avvento della terapia antibiotica anti-tubercolare, come, ad esempio, lo pneumotorace terapeutico di Forlanini.

Nel gennaio del 1944 Schatz, Bugie e Waksman scoprono la streptomina ed individuano la sua efficacia contro diversi batteri tra cui *M. tuberculosis*. Solo 15 mesi dopo la sua scoperta, la streptomina iniziò ad essere usata in clinica per il trattamento della tubercolosi. La streptomina era un buon farmaco, ma risultava essere gravato da una significativa neurotossicità e dal precoce sviluppo di resistenze. Contemporaneamente venne individuato l'acido para-amino-salicilico come agente antitubercolare. Una sperimentazione clinica

documentò il valore superiore della terapia combinata (streptomina e PAS) rispetto all'utilizzo di un singolo agente (16).

Alla scoperta dell'isoniazide nel 1951, seguì lo sviluppo della triplice terapia (streptomina, PAS ed isoniazide). Ne conseguirono la chiusura dei sanatori e la caduta in disuso di alcune procedure chirurgiche come lo pneumotorace terapeutico di Forlanini.

A metà degli anni '60 la disponibilità della rifampicina e della pirazinamide consentì l'introduzione della moderna "short course therapy" (17). Tutto questo garantì una drastica riduzione della morbilità e della mortalità nel corso del XX secolo. Tuttavia, verso la fine degli anni ottanta, si è assistito ad una marcata recrudescenza dei tassi di incidenza di tubercolosi in tutto il mondo. Alcuni fattori vennero associati alla nuova ascesa della malattia: l'aumento dei tassi di farmaco resistenza, la confezione con HIV, scarsi sistemi di controllo sanitari e incognite legate ai flussi migratori.

L'HIV e l'AIDS hanno profondamente modificato l'epidemiologia della tubercolosi e ne hanno abbreviato la storia naturale, aumentando considerevolmente la sua morbilità e mortalità (11). Diversi fattori indicano che l'infezione da HIV influenzò fortemente la ripresa della tubercolosi (11):

- l'infezione da HIV aumenta drammaticamente il rischio di sviluppare la malattia tubercolare in persone con un'infezione latente da *M. tuberculosis*;
- l'infezione da HIV accelera la velocità di progressione della malattia tubercolare nelle persone che hanno recentemente acquisito l'infezione da *M. tuberculosis*;
- l'infezione da HIV è associata a focolai di forme multiresistenti di tubercolosi (cioè resistenti almeno ad isoniazide e rifampicina) in ospedali e carceri;
- una persona immunocompetente infettata con *M. tuberculosis* ha un rischio di sviluppare la malattia tubercolare del 10% nel corso della vita. Questo rischio aumenta del 7-10% per anno nelle persone con infezione da HIV;
- nelle persone con infezione da HIV la mancanza di specifici reperti clinici, normalmente utilizzati per la diagnosi (positività al test cutaneo con la tubercolina e quadri patologici alla radiografia del torace), rende la diagnosi di tubercolosi più difficile. Il conseguente ritardo nella diagnosi e la mancanza di isolamento dei malati contribuiscono alla diffusione del *M. tuberculosis*.

Nel 1993 il *World Health Organization* dichiarò la tubercolosi un'emergenza globale di Sanità Pubblica; si stimavano circa 7 – 8 milioni di casi e 1,3 – 1,6 milioni di morti ogni anno nel mondo.

Il numero dei nuovi casi di tubercolosi è da sempre correlato con le condizioni economiche, la più alta prevalenza di TB, infatti, si registra nelle regioni con il PIL più basso, come l’Africa, l’Asia e l’America Latina. Nonostante le nazioni europee possiedano tassi di incidenza assai minori rispetto a questi paesi, la TB rimane uno dei principali problemi di Salute Pubblica. In molti stati dell’Europa Occidentale, la tubercolosi è spesso attribuibile ai migranti, e il numero totale di stranieri con tubercolosi attiva supera il numero dei casi di tubercolosi nella popolazione indigena. Fra le cause principali vi sono l’elevata prevalenza fra conviventi, un più alto tasso di infezione con HIV e condizioni di vita più disagiate in abitazioni sovraffollate. Misure di controllo e prevenzione focalizzate su questo gruppo a rischio stanno assumendo una sempre maggiore importanza nelle nazioni industrializzate a bassa prevalenza.

Situazione epidemiologica globale

Tutte le più aggiornate informazioni relative allo stato epidemiologico mondiale dell’infezione tubercolare sono presenti all’interno del *WHO Report 2011 – Global Tuberculosis Control*, che raccoglie i dati provenienti da 198 stati e regioni su un totale di 216.

Nel 2010, a livello globale sono stati stimati circa 8.8 milioni di casi incidenti di TB (128 / 100.000 abitanti per anno), la maggior parte dei quali si è concentrata in Asia (59%) e Africa (26%) (Fig.2).

I 5 stati con il più alto numero di nuove diagnosi di tubercolosi sono l’India (2.0 – 2.5 milioni), la Cina (0,9 milioni – 1,2 milioni), il Sud Africa (0,4 – 0.59 milioni), l’Indonesia (0,37 – 0,54 milioni) e il Pakistan (0,33 – 0,48 milioni). In India si concentra un quarto dei casi di tutto il mondo (19).

Sono stati identificati 22 Paesi ad elevata incidenza (*High-Burden Countries*) che da soli aggregano l’80% di tutti i casi dell’anno 2010: Afghanistan, Bangladesh, Brasile, Cambogia, Cina, Repubblica Democratica del Congo, Etiopia, India, Indonesia, Kenya, Mozambico, Birmania, Nigeria, Pakistan, Filippine, Federazione Russa, Sud Africa, Tanzania, Thailandia, Uganda, Vietnam e Zimbabwe.

Il numero dei decessi per tubercolosi nello stesso anno è stato di circa 1,4 milioni, di cui 350.000 attribuibili a infezione con HIV.

La situazione globale rispetto ai tassi di incidenza di tubercolosi multifarmaco-resistente (MDR) è poco chiara, principalmente a causa della mancanza di dati rappresentativi di ampi territori, quali l’India e svariati stati africani, che non possiedono adeguati programmi di sorveglianza. Per tubercolosi MDR si intende la tubercolosi provocata da ceppi di *M.*

tuberculosis resistenti almeno ad isoniazide e rifampicina, sono considerati *extensively drug-resistant* (XDR) quei ceppi MDR resistenti anche ai fluorochinolonici e ad almeno un antibiotico di seconda linea (amikacina, kanamicina o capreomicina). La proporzione globale di casi multiresistenti sul totale delle nuove diagnosi di tubercolosi fra il 1994 e il 2010 è di circa 3,4%, se si considerano tutti i casi precedentemente trattati tale proporzione risulta 19,8%, in entrambi i casi si evidenzia un'ampia variabilità geografica. Nel 2010 sono stati stimati 650.000 casi MDR in tutto il mondo.

I dati disponibili confermano che l'Europa dell'est e l'Asia centrale continuano ad avere la percentuale maggiore di tubercolosi MDR nel periodo 2007 - 2010.

Il tasso stimato di notifiche dei ceppi MDR è in aumento in nazioni come Botswana, Perù e Repubblica del Korea, mentre è stazionario in Estonia, Lettonia e Stati Uniti. In altre regioni è sostanzialmente stazionario, come in Russia.

Globalmente fra i ceppi di tubercolosi MDR, la percentuale di ceppi XDR è del 9,4%. (20).

Fra i 9 milioni di pazienti che sviluppano tubercolosi ogni anno, circa 1 persona su dieci è sieropositiva. Nel 2010 sono ben 1,1 milioni gli HIV positivi che si sono ammalati di tubercolosi (19).

Il test dell'HIV per i pazienti tubercolotici è oggi una pratica standard in molti paesi, specialmente nelle regioni africane, dove si registrano i più alti tassi di co-infezione nell'anno 2010 (44% dei casi di TB), seguite dalle regioni americane (17%). Nonostante l'infezione da HIV aumenti di 21 – 34 volte la probabilità di sviluppare tubercolosi, la copertura globale della terapia antiretrovirale (ART) nei pazienti con infezione da *M. tuberculosis* è scarsa (solo il 46%) (19).

Il trend di incidenza dell'infezione tubercolare è sceso gradualmente dal 1990 al 1997 in tutte le regioni OMS (Fig.3), per poi risalire nel 2001, quando l'epidemia da HIV raggiungeva il suo picco in Africa. Dal 2002 il numero di nuovi casi si è ridotto di circa 1,3% ogni anno. Anche la prevalenza è in diminuzione dal 1990, in maniera più rapida dal 1997. Se questo andamento dovesse essere confermato, i target stabiliti dai *Millenium Development Goals*, che si propongono di arrestare e invertire il trend di incidenza, prevalenza e mortalità, potrebbero essere conseguiti entro il 2015 (19, 21).

Una drastica riduzione del numero di nuovi casi e decessi per tubercolosi è stata ottenuta in Cina, dove, peraltro, i metodi utilizzati per la misura e il controllo dei trend epidemiologici forniscono un modello per molti altri paesi. Anche le regioni americane si distinguono per il successo ottenuto dalla lotta contro la tubercolosi, che ha favorito un declino dell'incidenza del 3,6% annuo.

Tuttavia nel 2009, si stima siano stati quasi 14 milioni i bambini con età inferiore a 15 anni che sono rimasti orfani a causa della tubercolosi (19).

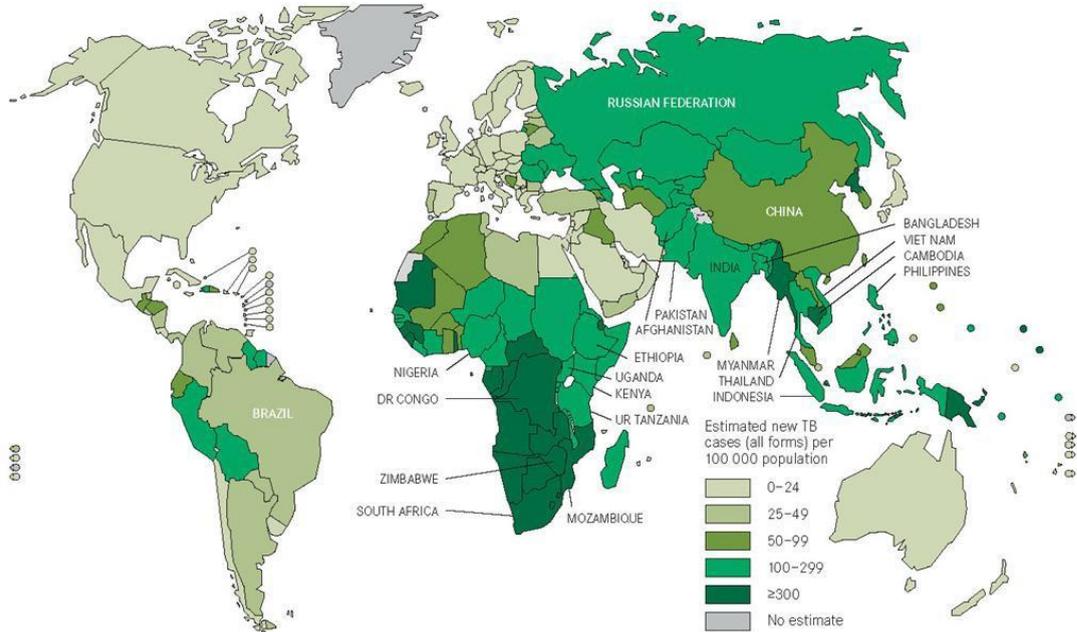


Figura 2 rappresentazione dei tassi di incidenza globali di tubercolosi stimati dal WHO, 2010.

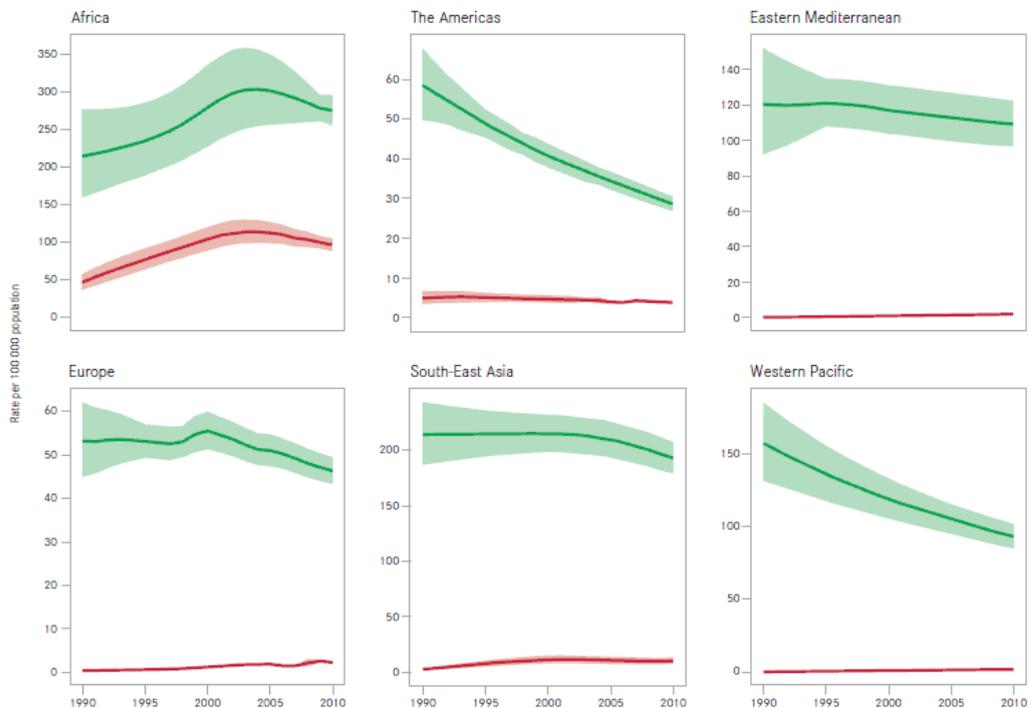


Figura 3 Trend dei tassi di incidenza distinti per singola macroarea geografica della tubercolosi stimati dal WHO, periodo di riferimento: 1990 – 2010.

Situazione epidemiologica europea

Considerando l'anno 2010, nella regione europea definita dal WHO, che comprende 52 nazioni, si concentra il 4,7% dei casi di tubercolosi di tutto il mondo, pari a 309.648 nuovi episodi confermati (34/100.000) su una stima totale di 418.000. L'87% delle nuove diagnosi è concentrata in 18 paesi a maggior prevalenza (HPC, *High Prevalence Country*), il cui tasso di notifica supera di ben otto volte quello delle restanti regioni. Come si può vedere dalla figura 4 l'incidenza è molto più alta nei paesi orientali rispetto a quelli occidentali (22).

La conferma colturale delle nuove diagnosi di tubercolosi, tuttavia, è estremamente minore fra i paesi non - EU/EEA (38.0%), rispetto ai paesi EU/EEA (65,5%), coerentemente ad una aderenza ai protocolli diagnostici e all'utilizzo di tecniche colturali più efficaci e moderne. Fra i paesi EU, tuttavia, la Francia e l'Italia riportano risultati colturali per meno del 60%.

Il trend di incidenza è in discesa di 1,7% annuo dal 2006 e nel 2010 ci sono state il 2,6% in meno di notifiche rispetto all'anno precedente (22).

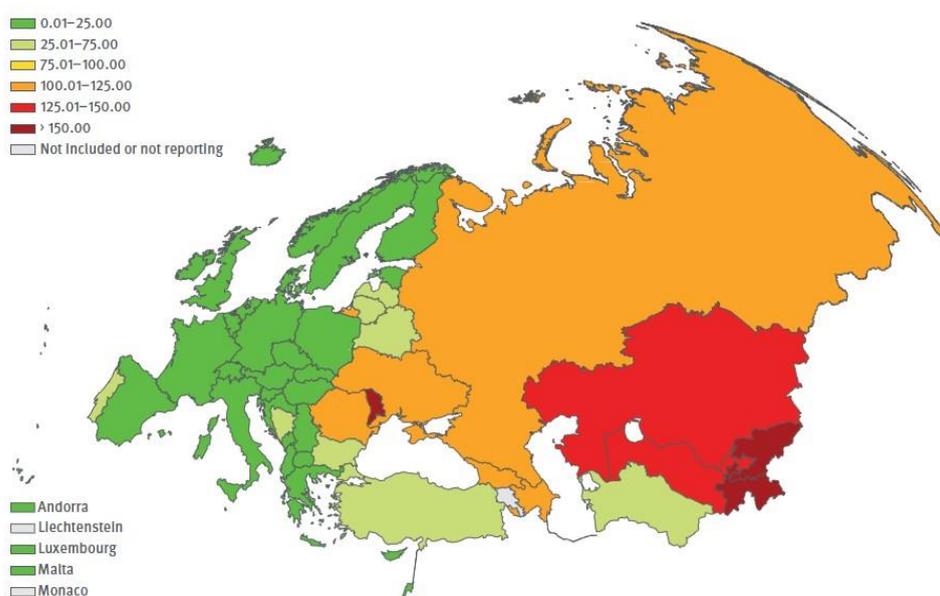


Figura 4 tassi di incidenza di tubercolosi per 100.000 abitanti, nelle regioni europee, WHO 2010

Nel 2010 si sono verificate 60.000 morti (5.4 – 8.3 / 100.000) attribuibili all'infezione da *M. tuberculosis*.

La maggioranza degli individui con co-infezione TB/HIV (85,6%) si concentra nei paesi non-EU/EEA, la prevalenza di questi fra tutti gli individui affetti da infezione tubercolare è aumentata da 3.4% nel 2008 a 5.5% nel 2010.

Il genere maschile è coinvolto circa il doppio di quello femminile. La fascia di età compresa tra 25 e 44 anni ascrive il 37,3% delle nuove diagnosi, soprattutto nelle HPC (22).

Analizzando i dati provenienti dall'area EU/EEA, che è composta da 27 stati membri, dall'Islanda e dalla Norvegia, l'incidenza è di 14,6/100.000, con un numero di casi di TB denunciati pari a 73.996 nell'anno 2010. Nell'EU il pattern epidemiologico della tubercolosi è eterogeneo. Come è infatti possibile dedurre dalla figura 5, alcuni stati quali Estonia, Lettonia, Lituania, Bulgaria, Polonia e Romania hanno un'incidenza di tubercolosi superiore a 20/100.000, mentre nelle altre nazioni il numero di casi annuo è nettamente inferiore. In questo secondo gruppo, che comprende peraltro l'Italia, la distribuzione delle infezioni da *M. tuberculosis* coinvolge in maniera predominante le grandi metropoli, che sono, quindi, caratterizzate da tassi di incidenza maggiori rispetto alla media del territorio nazionale. Il quadro epidemiologico che si osserva, ad esempio, in Inghilterra, è paradigmatico di questo fenomeno che ha assunto il nome di *Urban TB*: l'incidenza di questa nazione è di 14,8/100.000, mentre nella città di Londra essa arriva fino a 44,4/100.000 (Fig. 5). Questo disequilibrio è ampiamente giustificato da una più consistente presenza, in città, di gruppi vulnerabili, afflitti da fattori socio-economici negativi, come migranti, rifugiati, senzatetto, carcerati, tossicodipendenti, alcolisti e sieropositivi (23).

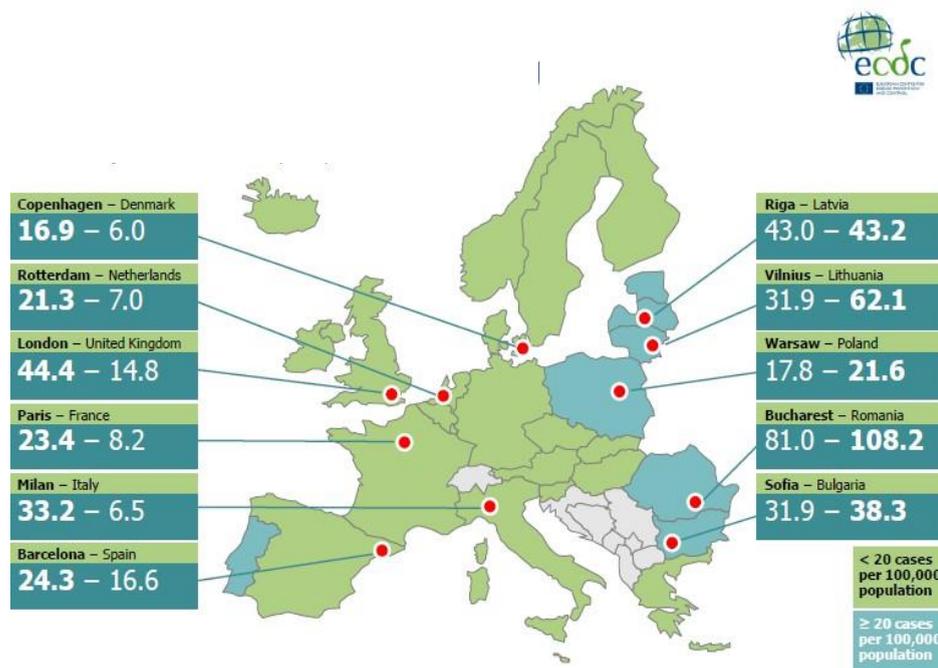


Figura 5 tassi di incidenza della tubercolosi per 100.000 abitanti nelle regioni e nelle principali città dell'area EU/EEA.

In tutti gli stati membri decresce progressivamente il numero di casi di tubercolosi fra la popolazione autoctona a fronte di un aumento all'interno delle persone di origine straniera. Circa il 25% (N=18.601) delle nuove diagnosi avviene negli immigrati, questa percentuale è

assai più elevata in 12 stati, raggiungendo l'acume in Norvegia e Svezia, dove è, rispettivamente, 85 e 86%. Solo in Spagna si è osservato un aumentato numero di casi fra gli autoctoni (22).

Mentre la percentuale di recenti infezioni provocate da ceppi multiresistenti mantiene un andamento stabile rispetto ai 5 anni precedenti (circa 2% e circa 3% nelle sole forme polmonari), il numero di tubercolosi XDR è cresciuto del 35% nel 2010 (22).

Per quanto concerne gli esiti del trattamento nelle diverse nazioni che costituiscono l'EU/EEA, si registrano il 79% di *outcome* favorevoli fra i casi confermati dalla coltura positiva, il 7% di morti, il 2% di fallimenti terapeutici, il 6% di persi al *follow up*, mentre il 5% dei pazienti ha cambiato la propria residenza e il 2% è tuttora in terapia (22).

Situazione epidemiologica italiana

In Italia sono presenti notevoli differenze tra Regioni sia nei tassi grezzi di incidenza totali sia nei tassi disaggregati per classi di età e nazionalità, che riflettono da una parte la differenza a livello territoriale delle caratteristiche della popolazione suscettibile, e dall'altra una diversa sensibilità e scarsa considerazione del problema da parte dei servizi e degli operatori sanitari (con conseguente sottonotifica di casi o possibile selettività nei confronti di specifiche fasce di popolazione).

Nel decennio 1999-2008 i tassi di incidenza di tubercolosi sono stati stabili e inferiori ai 10 casi per 100.000 abitanti, valore che pone l'Italia al di sotto della soglia per essere considerato un paese a bassa prevalenza ed è quindi tra quelli a cui l'Organizzazione mondiale della sanità non fornisce assistenza prioritaria nella lotta alla tubercolosi (24, 25).

Nel 2008 sono stati notificati 4.418 casi di tubercolosi in 19 Regioni e 2 Province autonome (P.A. Bolzano e P.A. Trento), con una diminuzione del 2,4% dei casi rispetto al 2007 (4.527). Questi dati confermano l'andamento in discesa osservabile dal 1995 (nel periodo 1995 - 2006 il decremento è stato superiore al 20%).

Il trend decennale mostra un leggero aumento dell'incidenza nel Nord Italia (incidenza media: 10,2 / 100.000), una sostanziale stabilità al Centro (9,5 / 100.000) ed una riduzione nel Sud e nelle isole (circa 3,5 / 100.000).

Nel 2008 Lombardia, Lazio, Veneto, Emilia Romagna e Piemonte hanno notificato da sole più del 70% dei casi totali di tubercolosi. Il tasso di incidenza più elevato si è riscontrato in Lombardia (oltre 13 casi/100.000 abitanti). L'analisi per Provincia di notifica evidenzia come un quarto dei casi sia notificato a Roma e a Milano (valore % cumulato) (24).

Nel periodo 1999-2008 per tutte le forme di tubercolosi la classe di età che presenta l'incidenza più elevata è quella anziana. Tuttavia, nel decennio l'incidenza in questa classe è

andata via via diminuendo, a fronte di un costante aumento del numero di casi di tubercolosi tra i giovani. Infatti nella classe di età 15-24 anni nel 2008 l'incidenza è risultata aumentata del 40% rispetto al 1999, pari a 9 casi/100.000 giovani. Nella fascia 0 – 14 anni l'incidenza è rimasta stabile (Fig.6) (24).

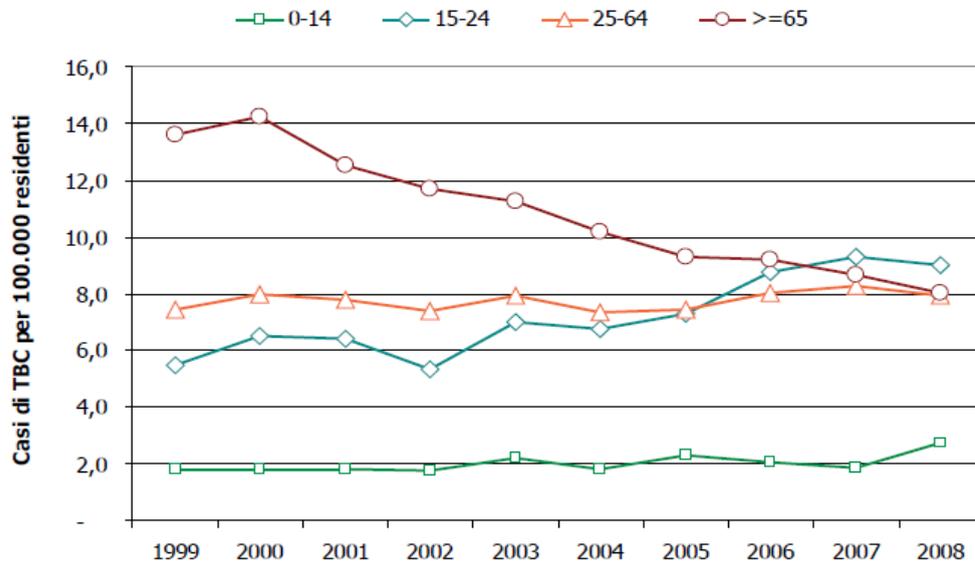


Figura 6 Tassi di incidenza di tubercolosi per classi di età dal 1999 al 2008

Negli ultimi 50 anni il trend di incidenza della malattia è risultato diverso per sede anatomica: la tubercolosi polmonare, in netta e decisa diminuzione fino agli anni '80, è divenuta successivamente relativamente stabile, con tassi annuali intorno a 6 per 100.000; viceversa, mentre prima degli anni '80 non si osservavano variazioni di rilievo nell'incidenza di tubercolosi extra-polmonare (oscillando intorno a valori pari a 0,4-0,5 casi per 100.000), nel periodo successivo l'incidenza è aumentata progressivamente fino a raggiungere più di 2 casi per 100.000 all'anno, con tassi di aumento annuale intorno all'8-12% a seconda del quinquennio considerato fino al 1995. L'aumento delle tubercolosi extra-polmonari a partire dalla fine degli anni '80 è stato essenzialmente dovuto all'introduzione della notifica di tutte le sedi di tubercolosi extra-polmonari, mentre fino al 1987 erano notificate solo quelle in fase contagiosa. Nell'ultimo decennio il tasso sembra essersi stabilizzato. L'interessamento polmonare costituisce, comunque, la maggior parte dei casi segnalati (circa il 74%), mentre i casi di tubercolosi extrapolmonare rappresentano, al 2008, circa un quarto del totale (24, 25). L'attuale situazione epidemiologica italiana riflette la presenza di gruppi ad alto rischio, come immigrati e sieropositivi per HIV, che concentrano un numero a poco a poco più alto di notifiche.

Dal 1999 al 2008, i casi di tubercolosi registrati in “cittadini nati all'estero” hanno rappresentato, nel complesso, il 36,5% del totale dei casi notificati in Italia. Nel periodo esaminato si è verificato un costante aumento di tale proporzione (dal 22% del 1999 al 46% nel 2008). Chiaramente tali valori risentono della distorsione dovuta alla componente irregolare, differente per le varie comunità, perché rende impossibile conoscere i denominatori reali. Questa analisi risente, inoltre, della diversa composizione delle varie comunità, della quota variabile di stranieri irregolari e di numerosi fattori sociali, economici, climatici, nutrizionali e psicologici che incidono sullo stato di salute e sull'accesso ai servizi di diagnosi e cura, predisponendo alla malattia tubercolare e alla sua diffusione. Inoltre, per le comunità culturalmente meno integrate e più fragili, il grado di sottotifica potrebbe essere significativo (24).

Utilizzando come denominatore le stime del totale degli stranieri in Italia e per singola Regione al 31 dicembre 2007, si evidenziano tassi di incidenza di tubercolosi negli stranieri molto elevati in gran parte delle Regioni con intervalli di confidenza (IC 95%) molto variabili in relazione alla numerosità della popolazione immigrata. In particolare, in Lazio, Lombardia e Veneto l'intervallo di confidenza inferiore delle stime di incidenza si colloca al di sopra di 50 casi per 100.000 immigrati.

La distribuzione dei casi notificati per nazionalità ed età evidenzia come i cittadini immigrati integri la fascia di età intermedia (25 – 39 anni), poco rappresentata nella popolazione di origine autoctona (24).

Tra i cittadini nati all'estero, il continente di provenienza prevalente risulta essere l'Africa, con circa il 35% dei casi segnalati nell'intero decennio; seguono l'Europa e l'Asia. La tipologia dei recenti flussi migratori ha rivoluzionato la distribuzione epidemiologica della tubercolosi in base alla provenienza all'interno della popolazione immigrata. Per tale motivo nel 2008, tra le nazionalità con maggior numero di casi di tubercolosi spicca la Romania con 505 casi seguita da Marocco, Senegal, Perù, Pakistan e India.

Alcune nazionalità sembrano essere a particolare rischio con tassi maggiori o intorno a 100 casi per 100.000 residenti: il Corno d'Africa (Etiopia, Eritrea, Somalia), Senegal, Sudan, Costa d'Avorio, Nigeria, Perù, Bolivia, India, Pakistan e Bangladesh.

Considerando il periodo 2004 – 2007 la percentuale di tubercolosi mono e multifarmaco-resistente si è mantenuta abbastanza stabile oscillando complessivamente tra il 10% e il 12% dei casi, mentre nel 2008 tale valore è stato superiore al 14% dei casi di tubercolosi; per quanto riguarda la tubercolosi multi-farmaco-resistente (MDR) i valori oscillano tra 3% e il 4% del totale dei ceppi/paziente analizzati. Dalle stime effettuate, se per i casi tubercolosi precedentemente trattati i trend ipotizzati sono controversi ma

tendenzialmente in diminuzione, per i nuovi casi il trend di MDR sembra essere comunque in aumento, soprattutto fra i pazienti di origine straniera (24).

L'esito del trattamento è soggetto a notifica e sorveglianza, come suggerito dal progetto Euro-TB, in Emilia-Romagna, Friuli Venezia Giulia, Lombardia, Marche, Piemonte, Toscana e Veneto, regioni che rappresentavano il 67% dei casi di tubercolosi notificati nel 2006 a livello nazionale e il 71% nel 2007. Complessivamente, tra gli esiti noti, nel 67% dei casi erano favorevoli (paziente guarito e/o trattamento completato) e nel restante 33% sfavorevoli (deceduto, fallimento terapeutico, trasferito, ancora in trattamento e/o trattamento interrotto) (Fig.7).

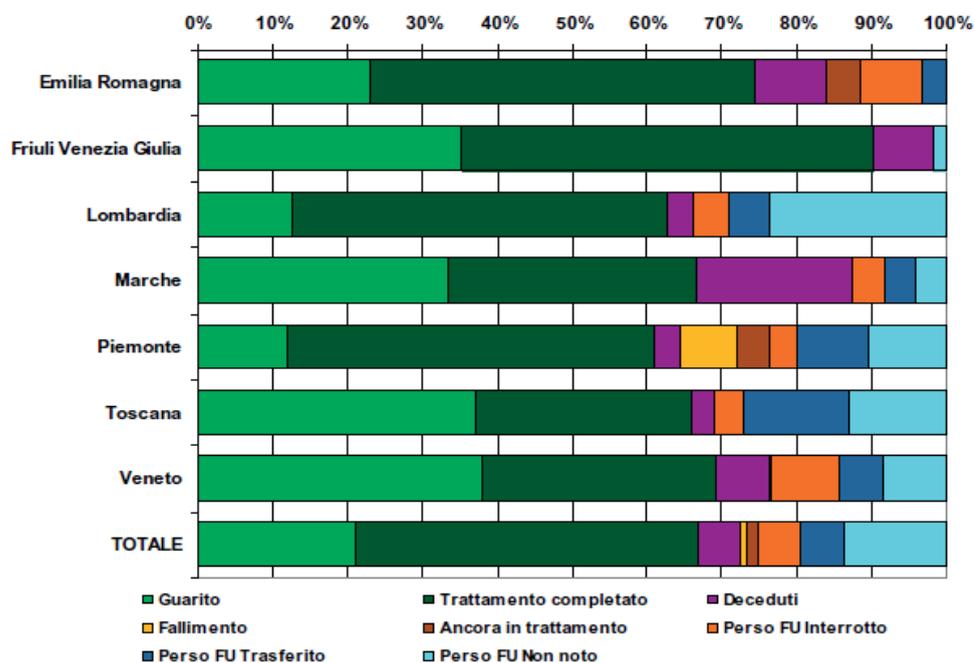


Figura 7 Esiti di trattamento TBC per Regione (esclusi non pervenuti) – Anno 2007.

Nell'ultimo decennio, mentre il numero totale di casi di AIDS è notevolmente diminuito per l'introduzione delle terapie antiretrovirali, in proporzione la percentuale di casi di AIDS diagnosticati per insorgenza di tubercolosi è aumentata fino a raggiungere il 10% del totale dei casi di AIDS. In Lombardia e nel Lazio si concentra oltre il 38% dei casi totali di TBC/AIDS notificati nel periodo dal 1999 al 2008. Tra gli immigrati, specialmente provenienti dall'Africa, i tassi di coinfezione sono maggiori che tra gli italiani (24).

In Italia la facilità all'accesso e l'efficacia della terapia antitubercolare ha consentito di ottenere, negli ultimi 50 anni, una drastica riduzione della mortalità per infezione da *M. tuberculosis*, che nel 2006 si attesta a 0,7 per 100.000 (24, 25).

Situazione epidemiologica nell'area milanese

Nell'area metropolitana della città di Milano nel decennio 2000 – 2010, il tasso di incidenza della tubercolosi si è mediamente attestato a 19,1 casi per 100.000 abitanti, seguendo un trend relativamente stabile. Un picco di incidenza è stato raggiunto, tuttavia, nell'anno 2009 (22,19/100.000), mentre nel 2010 l'incidenza era 18,5/100.000 (26).

Confermando la tendenza nota come “*Urban TB*” e precedentemente descritta per alcune grandi metropoli dell'UE/EEA (23), l'incidenza a Milano è assai più alta della media regionale e nazionale per ogni anno considerato, come è possibile vedere in figura 8.

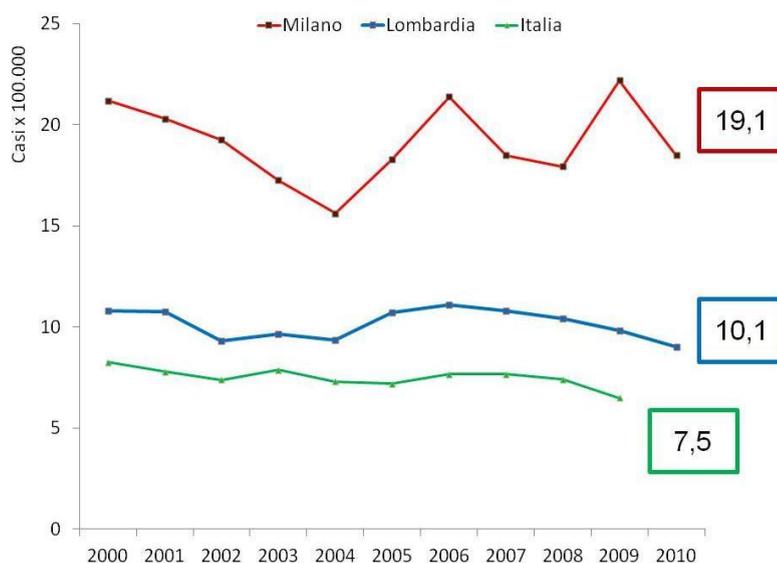


Figura 8 trend incidenza TB a Milano e media della Lombardia e dell'Italia.

Il numero di nuovi casi di tubercolosi a Milano notificati dal Centro Regionale di Riferimento per il controllo della TBC - Istituto Villa Marelli A.O. Niguarda, è di circa 400 ogni anno, dei quali, a conferma del dato nazionale, la maggior parte è di origine straniera. La percentuale di pazienti immigrati è progressivamente aumentata dal 2001 (61%) al 2010 (71%).

La quota prevalente di casi di tubercolosi fra gli immigrati nell'anno 2010, estratta per macroarea geografica, proviene dal Sud America (circa 31%), seguita da Asia (27%), Africa (25%) ed Europa (15%). Nella tabella 3 è, invece, efficacemente ritratta la frequenza delle nuove diagnosi per singola nazionalità, in rapporto alla rappresentazione dell'etnia sul territorio metropolitano milanese nell'anno 2010 (26).

	% presenza etnia	% casi TBC per Paese sul totale stranieri
Sry Lanka	6,1	2
Etiopia *	0,3	2,4
Senegal *	0,8	2,7
Eritrea *	1,2	3
Egitto	13	3,4
Marocco *	3,5	4,1
Cina	15,5	6,8
Ecuador	6,4	6,8
Romania *	5,6	13
Filippine *	15,5	16,1
Perù *	7,8	18,9

Tabella 3 Colonna sn: percentuale corrispondente alla rappresentazione territoriale dell'etnia fra gli immigrati nell'area metropolitana di Milano (fonte: Comune di Milano), colonna destra: percentuale dei casi di TB per singola nazionalità, anno 2010.

La distribuzione per classi di età conferma il dato nazionale con interessamento negli stranieri delle classi intermedie (picco tra i 25-34 anni), mentre per gli italiani rileva un andamento crescente a partire dai 45 anni di età (24). Nel 5% dei casi totali segnalati ogni anno l'infezione da *M. tuberculosis* colpisce i bambini. In media ogni mese viene segnalato un caso che frequenta collettività scolastiche.

Secondo quanto riportato dal Dott. L.R. Codecasa, responsabile dell'Istituto Villa Marelli, nell'ambito dell'*Euro-TB day 2012*, l'esito del trattamento nella città di Milano annovera un discreto successo, essendo favorevole in quasi il 90% dei pazienti.

1.3 PATOGENESI E STORIA NATURALE

Modalità e rischio di infezione

La tubercolosi si trasmette per contagio interumano o più raramente per contatto con materiali infetti. L'abituale sorgente di infezione è rappresentata dall'espettorato di un paziente affetto da tubercolosi polmonare "aperta" bacillifera. Altre possibili veicoli sono le urine (tubercolosi renale) e il pus dei focolai ossei. La più frequente via di infezione è, pertanto, quella aerogena a seguito dell'inalazione delle goccioline aerosolizzate, dette *droplet nuclei*, nell'ambiente attraverso la tosse, gli starnuti e la fonazione. Si contano circa 3000 nuclei di goccioline bacillifere per ogni colpo di tosse. Le più piccole (5-10 µm di diametro) possono rimanere in sospensione in aria per diverse ore ed essere inalate nelle vie aeree successivamente. Nel passato una fonte di infezione comune era rappresentata dal latte, proveniente da mucche tubercolotiche, contenente *M. bovis* e la corrispondente via di acquisizione quella gastrointestinale. Oggigiorno risulta assai più rara in relazione ai rigorosi controlli veterinari e al processo obbligatorio di pastorizzazione del latte. L'infezione per via cutanea è eccezionale e può interessare i patologi o il personale di laboratorio (3, 27, 28). Il rischio di acquisizione dell'infezione da *M. tuberculosis* dipende sostanzialmente, ma non solo, da fattori esogeni: probabilità di contatto con un caso fonte di infezione, intimità e durata del contatto, grado di contagiosità del caso e ambiente in cui esso si realizza. Diversi studi hanno evidenziato come un ruolo precipuo nella diffusione dell'infezione venga ricoperto dai pazienti bacilliferi il cui espettorato contiene bacilli acido-alcol resistenti (10^5 BAAR/ml), ovvero pazienti affetti da tubercolosi polmonare cavitaria endobronchiale o laringea. I pazienti caratterizzati da esame microscopico negativo e coltura positiva sono meno contagiosi, ancor di meno quelli con coltura negativa o colpiti da quadri extrapolmonari. Il sovraffollamento di ambienti chiusi, nonché la scarsa ventilazione degli stessi, costituiscono due fattori molto rilevanti in quanto aumentano la probabilità di contatto con un caso indice. Inoltre a causa del ritardo con il quale il paziente giunge all'attenzione del medico, si stima che, prima che venga identificato un caso positivo, vengano infettati due o tre contatti (28). Lo sviluppo e l'evoluzione dell'infezione tubercolare sono condizionati da diversi fattori, alcuni legati al microrganismo (carica microbica, virulenza) altri all'ospite. Dopo l'esposizione, 1-2% dei contatti immediatamente sviluppa una tubercolosi attiva, un terzo un'infezione latente e due terzi rimangono non infetti. Tra coloro che hanno una infezione latente il 5-10% evolverà verso una TB attiva nel corso della vita (21, 28). Il rischio di sviluppare la malattia dipende precipuamente da fattori endogeni legati all'ospite

rappresentati dall'innata suscettibilità individuale e, soprattutto, dallo stato funzionale dell'immunità cellulo - mediata. Il rischio di ammalarsi è massimo nei primi due anni successivi all'infezione, benché anni dopo i bacilli quiescenti possono riattivarsi per produrre tubercolosi secondarie molto contagiose. Un altro evento che può favorire la malattia è rappresentato dalla reinfezione, avvenimento più probabile nelle aree con un elevato tasso di trasmissione. Un ampio spettro di malattie concomitanti possono favorire con variabili livelli di permissività l'evoluzione dell'infezione verso il quadro clinico conclamato. La più importante condizione patologica è rappresentata dall'infezione da HIV: il rischio è correlato direttamente al grado di immunosoppressione. Altre malattie favorevoli alla riattivazione di una infezione quiescente sono: la silicosi, i linfomi, la leucemia, l'emofilia, l'insufficienza renale cronica e l'emodialisi, il diabete mellito di tipo 1, le terapie immunosoppressive e alcune condizioni associate a malnutrizione come la gastrectomia e i *by-pass* digiuno ileali (3, 28). L'età costituisce un fattore importante nel condizionare l'evoluzione verso la malattia. I tre periodi della vita durante i quali l'infezione ha maggiori probabilità di esitare in malattia sono l'infanzia, la tarda adolescenza e la prima età adulta, la senescenza (28):

- a. Nei bambini al di sotto dei quattro anni è frequente che all'infezione faccia seguito direttamente la malattia, nota come *tubercolosi primaria*, caratterizzata da una progressione locale e disseminata (malattia miliare e meningea). Dai cinque anni alla pubertà risulta meno probabile tale evoluzione mentre non muta il rischio di acquisizione dell'infezione. La prognosi a breve termine è buona benché sia elevato il rischio di riattivazioni con forme cavitari negli anni successivi all'infanzia, se la malattia non è correttamente trattata.
- b. Negli adolescenti e nei giovani adulti il quadro clinico esordisce con una tubercolosi polmonare dei lobi superiori. Dato l'elevato tasso di cutinegatività nei paesi industrializzati, in tale fascia di età la malattia tubercolare deve essere interpretata come il risultato della trasmissione di un'infezione recente piuttosto che l'espressione di una riattivazione di un'infezione acquisita nell'infanzia. L'infezione acquisita nell'età adulta ha una probabilità di evoluzione verso la malattia del 2% dopo i 30 anni, rispetto al 23% della fascia di popolazione con età 15-19 anni. L'esordio si verifica generalmente in tre mesi o entro un anno al massimo dall'esposizione.
- c. L'incidenza della tubercolosi nell'età senile è più alta rispetto alle precedenti fasi della vita: la parziale compromissione della funzione di sorveglianza esercitata dal sistema immune favorisce tale evoluzione, dando origine alla tipica forma polmonare apicale posteriore. Tuttavia diversi studi hanno dimostrato come le persone anziane sono spesso negative alla cutireazione (70-80%), sia perché mai infettate sia per un

efficiente fenomeno di *clearing* dell'infezione da parte del sistema immune con la conseguente perdita della reattività tissutale cutanea ritardata. Le persone cutinegative sono suscettibili all'acquisizione di nuove infezioni e presentano una probabilità di sviluppo della malattia attiva pari a quella degli adolescenti (28).

L'espressione della malattia sembra risentire anche dell'influenza di fattori genetici. Studi riportano come l'allele HLA-DR2 si associ a un rischio aumentato di progressione verso una forma polmonare avanzata, l'allele DRB1*1501, oltre a ciò, si correla con un rischio più alto di fallimento terapeutico, mentre DRB1*1502 avrebbe un ruolo protettivo. Un recente studio ha esaminato il polimorfismo del gene NRAMP1, un omologo umano del gene murino *Nramp 1* noto anche come *Bcg* e *Lsh/Ity*: tre alleli sarebbero più frequenti tra i pazienti con tubercolosi rispetto ai controlli. Non è ancora noto se il prodotto di tale gene giochi un ruolo diretto nella patogenesi della malattia (28).

Immunopatogenesi e storia naturale dall'infezione alla malattia

Lo sviluppo e l'evoluzione dell'infezione tubercolare sono condizionati da diversi fattori, tra i quali il più determinante è rappresentato dallo stato immunitario dell'ospite nei confronti dell'agente eziologico (Fig.9). L'interazione tra *M. tuberculosis* e l'ospite umano inizia nel momento in cui vengono inalati i nuclei di goccioline infette contenenti i microrganismi. La maggior parte di essi viene trattenuta ed eliminata dalla clearance muco ciliare respiratoria, cosicché solo una frazione pari al 10% del totale raggiunge gli alveoli. A tale livello macrofagi alveolari, non specificatamente attivati, fagocitano i bacilli (2f). A questo stadio l'attività batteriostatica macrofagica è probabilmente minima. L'equilibrio che si stabilisce tra la funzione macrofagica e la virulenza dei micobatteri si correla sia alla composizione della parete cellulare, ricca di lipidi, sia alla capsula glicolipidica che conferiscono resistenza al complemento e ai radicali liberi del fagocita. Le possibili evoluzioni sono due: i macrofagi limitano la moltiplicazione bacillare oppure questi proliferano lisando i macrofagi. In tale caso la replicazione dei bacilli intracellulari procede per settimane sia nel focus alveolare sia a livello di foci metastatici linfoematogeni. L'organismo ospite fronteggia l'infezione tubercolare attraverso lo sviluppo di due tipi reazioni immunitarie dalla cui interazione dipende la storia naturale dell'infezione e della malattia tubercolare: l'ipersensibilità di tipo ritardato e la reazione immunitaria cellulo - mediata attivante i macrofagi (3).

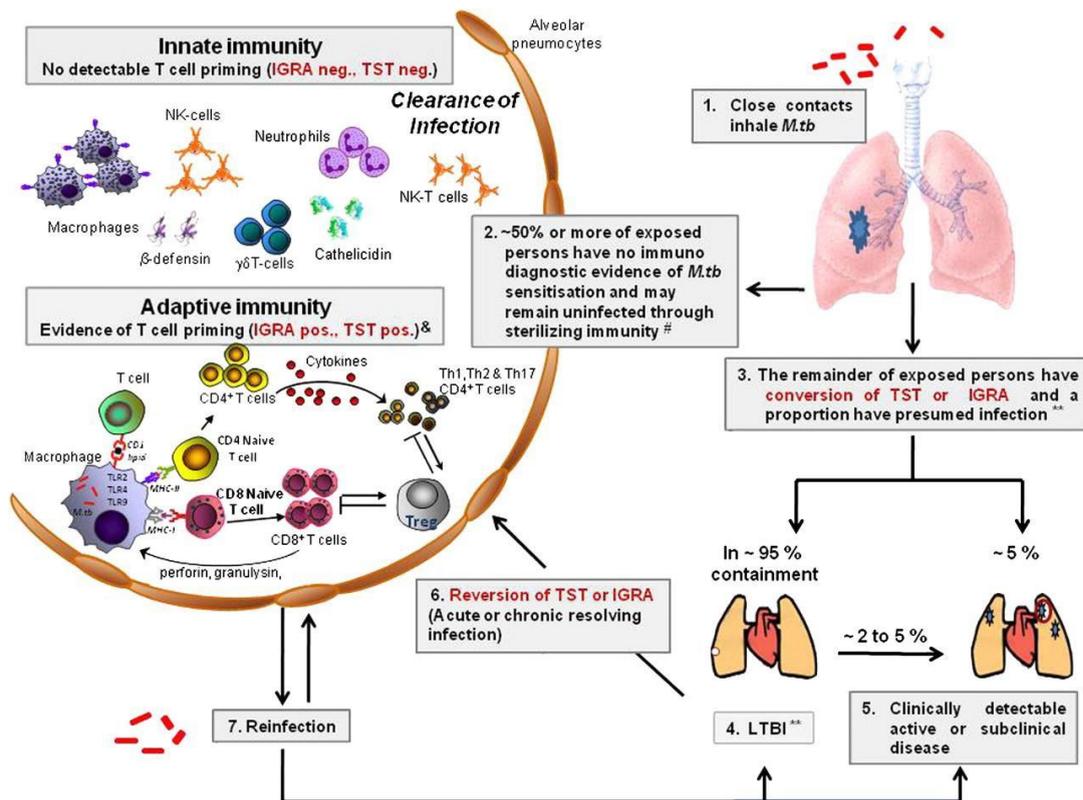


Figura 9 immunopatogenesi della tubercolosi

Ipersensibilità di tipo ritardato

L'ipersensibilità di tipo ritardato è un processo rapido e lesivo per l'organismo che determina la distruzione dei macrofagi non attivati contenenti bacilli proliferanti. Tale reazione, apparentemente svantaggiosa, costituisce in realtà una potente modalità di controllo della moltiplicazione dei micobatteri che nel citoplasma macrofagico presentano una crescita logaritmica. Il risultato della reazione è la formazione locale di un focolaio di necrosi caseosa al centro del granuloma tubercolare costituito dall'esterno all'interno da linfociti, macrofagi, cellule epitelioide tipo Langhans. Il *caseum* costituisce un ambiente sfavorevole per la crescita dei micobatteri a seguito della bassa tensione di ossigeno. L'evoluzione del focolaio caseoso è variabile, in quanto può subire una trasformazione fibrotica e calcifica oppure può andare incontro a una trasformazione estremamente sfavorevole per l'ospite, ovvero la colliquazione che ripristina le condizioni ottimali per una ripresa della crescita microbica per l'aumento della tensione di ossigeno (3). Si calcola che il tasso di proliferazione è di 5-6 logaritmi maggiore rispetto a una lesione non cavitaria. Inoltre il materiale liquefatto bacillifero tende a essere drenato dall'albero bronchiale producendo così una caverna tubercolare e una disseminazione broncogena dalla quale originano molteplici nuovi foci essudativi (28). Quando il livello di ipersensibilità è basso la reazione tissutale può essere non specifica e corrispondere all'accumularsi di un infiltrato costituito da polimorfonucleati e

cellule mononucleate, condizione nota come tubercolosi non reattiva. Lo spettro delle possibili reazioni immunologiche, da una florida risposta di ipersensibilità a una limitata e non specifica reazione tissutale, è simile a quello rilevato nel contesto della patogenesi della lebbra e a quello che accade nelle persone con infezione da HIV al decrescere della conta dei CD4⁺.

Risposta cellulo - mediata

La risposta cellulo - mediata rappresenta il più importante momento patogenetico nell'ambito della storia naturale dell'infezione. Essa consiste in un processo di attivazione dei macrofagi che acquisiscono piena competenza nell'espletare con la massima efficienza la loro attività battericida nei confronti dei bacilli fagocitati. La reazione è antigene specifica e richiede il fondamentale intervento dei linfociti Th. I macrofagi processano e presentano gli antigeni micobatterici esponendoli in associazione al complesso di maggior istocompatibilità MHC II ad una popolazione T CD4⁺ vergine capace di riconoscere, attraverso il TCR $\alpha\beta$, il complesso Ag-MHC II espresso sulla superficie dell' APC. L'interazione comporta in sequenza l'attivazione, la proliferazione clonale dei L-T e la secrezione di un ampio spettro di linfocine che intervengono nel processo di attivazione macrofagica, in seguito al quale aumenta la concentrazione di enzimi litici e di metaboliti intermedi che aumentano l'attività di *killing* intracellulare dei monociti. In particolare si verifica una preferenziale differenziazione dei L TH CD4⁺ attivati verso la sottopopolazione Th 1. Le due sottopopolazioni producono effetti diametralmente opposti sull'attivazione macrofagica: i Th

1 esplicano un'influenza stimolatoria attraverso la produzione di IL 2, TNF α antiteticamente ai Th 2 che mediante IL 10 e altre citochine esercitano un'azione inibitoria. Il rapporto tra le due sembrerebbe dipendere, almeno in parte, dal tipo e dalla qualità degli antigeni presenti (3). Il *pattern* citochinico prodotto dai linfociti e dai macrofagi attivati rende ragione della complessa cascata di eventi nei quali si articola l'intero processo immunopatogenetico dell'infezione tubercolare (30):

- **IL 12 :**

è una citochina prodotta dai macrofagi, svolge un ruolo primario nell'induzione della risposta Th 1; il contatto con i CD4⁺ aumenta la sintesi di IL 12 che agisce in modo paracrino sui linfociti stimolandone la differenziazione verso i Th 1, nonché l'attivazione. E' anche un potente induttore della secrezione di IFN γ da parte delle cellule T e NK (30).

- **IFN γ**
 è uno dei mediatori più importanti, viene prodotto dai CD4+ ed agisce come potente attivatore dei macrofagi che amplifica la secrezione di IL 12 da parte degli stessi. Gli effetti attivanti dell' IFN γ si traducono in: maggiore capacità di fagocitosi, aumento del numero di molecole di MHC II sulla superficie cellulare (il che facilita la presentazione degli antigeni), incremento della sintesi di fattori di crescita polipeptidici, come PDGF e TGF β che a loro volta stimolano la proliferazione dei fibroblasti e la sintesi di collagene (30).

- **IL 2**
 induce la proliferazione dei L T CD4+ sia con meccanismo autocrino sia paracrino, favorendo lo *switch* verso la sottopopolazione Th 1 (30).

- **TNF α**
 esercita un ampio spettro di azioni sulle cellule endoteliali: aumento di sintesi prostaciline con vasodilatazione locale, maggiore espressione delle E-selectine che promuovono l'adesione di linfociti e monociti all'endotelio, secrezione di fattori chemiotattici come IL 8. L'azione combinata di questi mediatori promuove la diapedesi delle cellule immunocompetenti verso il *focus* infiammatorio (30).

A livello della sede dell'infezione primaria si verifica la formazione dei tubercoli, ovvero i granulomi specifici che costituiscono la struttura nella quale si organizzano le cellule immunocompetenti accumulate nel *focus*. Tali lesioni sono formate, procedendo dall'esterno all'interno da linfociti, macrofagi attivati, noti anche con il nome di cellule epitelioidi, e cellule di Langhans. Queste sono cellule giganti plurinucleate con nuclei periferici derivanti dalla fusione di singoli macrofagi. Al centro si produce un'area di necrosi che costituisce il risultato della più immediata delle risposte che l'organismo mette in atto per contenere l'infezione a discapito, tuttavia dell'integrità anatomica tissutale (3,28). Alla distruzione tissutale parteciperebbero i processi coagulativi, i composti intermedi del metabolismo azotato e ossidativo macrofagico, e alcune citochine come il TNF α . Anche se *M. tuberculosis* può sopravvivere, la crescita è inibita in quanto l'ambiente necrotico è anossico a bassa tensione di ossigeno e pH. Nel momento in cui interviene l'immunità cellulo-

- mediata, si verifica una neutralizzazione di bacilli per la potenziata attività di *killing* macrofagica, senza più distruzione tissutale. Bacilli vitali possono rimanere quiescenti all'interno dei macrofagi anche per tutta la vita. Essi sono noti come i *dormants*, una popolazione di micobatteri che è alla base della non eradicabilità completa dell'infezione

tubercolare. Alcune lesioni guariscono per fibrosi e infine calcificano a livello sia parenchimale sia linfonodale (*complesso di Reinke*). In taluni casi la risposta attivante macrofagica è debole e la proliferazione micobatterica può essere arrestata solo con una reazione di ipersensibilità di tipo ritardato molto intensa che comporta una massiva distruzione tissutale. La lesione tende a ingrandirsi, il materiale caseoso va incontro a liquefazione: le pareti bronchiali, così come i vasi, sono invase e distrutte con formazioni di caverne tubercolari, favorendo da un lato la diffusione broncogenica e dall'altro quella ambientale (3,27). L'interazione attraverso un complesso *network* citochinico costituisce una fase cruciale nella elaborazione di una risposta efficiente verso l'infezione tubercolare. Un ruolo determinante è rivestito dai CD4+: patologie nelle quali vi sono difetti qualitativi e/o quantitativi di tali cellule, di cui è paradigma l'infezione da HIV, si caratterizzano per una incapacità di contenere la proliferazione micobatterica, aumentando in modo significativo le probabilità di evoluzione verso la malattia. Ciò discende dal fatto che i linfociti CD4+ sono la fonte principale di sintesi di IFN γ , la cui funzione è quella di rendere competenti i macrofagi, stimolandoli a produrre fattori inibenti i bacilli come TNF α e la 1,25-diidrossivitamin D. Inoltre è nota una popolazione di L T dotati di recettore $\gamma\delta$ che proliferano in risposta agli antigeni micobatterici: il loro ruolo non è ancora del tutto definito (3,27). I fattori di virulenza dei micobatteri, in particolar modo gli antigeni proteici, hanno una peculiare capacità di stimolare simultaneamente i macrofagi a sintetizzare un *pattern* citochinico (IL 10 e TGF β) inibente il rilascio di IFN γ e IL 12. La parziale soppressione dell'attività cellulare - mediata contribuirebbe così a generare uno stato di immunodepressione, a ridurre la funzione effettrice macrofagica, nonché a favorire la progressione della malattia tubercolare (27).

1.4 MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il contatto tra *M. tuberculosis* e l'organismo ospite è un evento che può condurre a conseguenze cliniche molto diverse fra loro. E', pertanto, importante differenziare tra infezione e malattia, distinzione molto importante per tutti quegli agenti infettivi che hanno sviluppato un buon rapporto di simbiosi con l'ospite, per cui solo una piccola percentuale dei soggetti infettati svilupperà malattia.

Nel caso della tubercolosi, infatti, solo una percentuale variabile tra il 5 e il 10% dei soggetti infetti svilupperà la malattia attiva, mentre nella restante parte il contagio decorrerà in maniera del tutto asintomatica. L'equilibrio tra microrganismo e ospite può essere influenzato da numerosi fattori, primo fra tutti lo stato immunitario dell'ospite. E' possibile, quindi, definire tre eventi principali che delineano, in un unico *continuum* temporale, la storia clinica della TB: l'infezione primaria asintomatica, la tubercolosi primaria e la tubercolosi post – primaria (3,28).

Infezione primaria asintomatica

L'infezione primaria è conseguenza del primo contatto in assoluto tra il *bacillo di Koch* e l'essere umano; nelle zone ad alta endemia è più frequente nei bambini, ma attualmente tende a colpire soprattutto in tarda adolescenza e prima età adulta. Il contagio avviene tramite l'inalazione di particelle infettanti, originate dalle secrezioni respiratorie di un soggetto infetto, che le elimina nell'ambiente con il tossire, lo starnutire o il parlare. Poiché la principale via di trasmissione di *M. tuberculosis* è quella aerogena, abitualmente la malattia è localizzata al polmone, dove si ha la formazione del cosiddetto complesso primario (*complesso primario di Ghon*), rappresentato dal focolaio parenchimale e dall'adenite satellite interbronchiale, parailare e trachobronchiale, connessi tra loro dalla linfangite intermedia (3).

Il tubercolo primario (focolaio primario di Gohn) è un elemento nodulare, o un insieme di elementi nodulari confluiti tra loro delle dimensioni di un chicco di riso o di un pisello, al centro del quale si trova il focolaio di necrosi caseosa circoscritto da una barriera fibrillare - collagenare. Lo sviluppo dell'immunità cellulo – mediata è, infatti, in grado di controllare l'infezione, di conseguenza il complesso primario evolve progressivamente verso la fibrosi, spesso seguita da calcificazioni radiograficamente evidenziabili e malgrado la disseminazione in altri organi, non si svilupperà nessuna ulteriore lesione.

La sintomatologia clinica è completamente assente, per cui gli unici segni dell'avvenuta infezione primaria sono di carattere radiologico (opacità parenchimali e linfoghiandolari,

peraltro apprezzabili solo quando raggiungono dimensioni di una certa entità) e biologico (viraggio della positività alle prove tubercoliniche tra la 4^a e la 6^a settimana dal contagio) (3). E' d'uopo ricordare che in alcuni rari casi l'infezione primaria asintomatica può avere altre possibili localizzazioni, quali il cavo orale, la cute e l'intestino.

Tubercolosi primaria

Nei bambini e nei soggetti con immunità compromessa, come quelli con malnutrizione o infezione da HIV, si sviluppa, in genere, una malattia tubercolare primaria, sintomatica, in cui possono comparire tre quadri clinici principali.

La *tubercolosi morbigena semplice* è l'equivalente clinico dei fenomeni di tipo allergico locale ed extrapolmonare. Le immagini parenchimali, indicate con la denominazione di epitubercolosi (tenui addensamenti a carttere lobare o sublobare) sono attribuibili a un difetto di canalizzazione bronchiale da compressione adenopatica che condiziona lo sviluppo di enfisema ostruttivo e bronchiectasie. La comparsa dei sintomi è brusca: febbre sub continua, tosse modesta, scarsa o assente espettorazione e sudorazione si accompagnano ad un rialzo della VES e ad una vivace risposta tubercolinica. Si possono inoltre associare condizioni morbose caratteristiche extrapolmonari come la *cheratocongiuntivite flitturnolare* e, soprattutto, l'*eritema nodoso*, quest'ultimo caratterizzato dalla comparsa di noduli sottocutanei infiltrati e dolorosi, di colorito rossastro - violaceo. Il decorso si dimostra, in genere, favorevole, con risoluzione clinica in circa due settimane (3).

La tubercolosi primaria *ad evoluzione tisiogena* si manifesta, invece, quando il mancato controllo dell'infezione, a causa della caduta dei meccanismi di difesa, provoca un rapido ingrandimento della lesione primitiva. La caverna primaria che ne consegue è di solito riconoscibile per la concomitante presenza di un'adenopatia; la colliquazione del caseum può rendersi responsabile di tutti quei quadri clinici da diffusione broncogena (polmonite caseosa, etc.) o ematogena (*miliare acuta del periodo primario*), tipici in corso di tubercolosi post – primarie (3).

Infine, la terza forma è l'*Adenopatia tisiogena ilo-mediastinica*, indice di una ripresa evolutiva dei focolai linfoghiandolari residui. E' più frequente nell'infezione primaria del bambino, ma si osserva anche nell'adulto e nelle infezioni post-primarie. Risulta più frequente nell'infezione primaria infantile ma si osserva anche nell'adulto e nelle infezioni post primarie. L'interesse di questo quadro morboso è duplice: da un punto di vista diagnostico per differenziarla da altre adenopatie, sistemiche o neoplastiche, e dal punto di vista evolutivo della malattia tubercolare in quanto rappresenta il punto di partenza di una generalizzazione dell'infezione (3).

Tubercolosi post – primaria

La tubercolosi post – primaria può derivare sia dalla riattivazione endogena di una infezione primaria latente, sia da una reinfezione esogena, ed è di solito localizzata ai segmenti apicali e posteriori dei lobi superiori, a livello dei quali l'elevata concentrazione di ossigeno favorisce la crescita micobatterica. Nel primo caso la malattia nasce conseguentemente alla persistenza di batteri quiescenti (*dormants*), circoscritti all'interno del complesso di Ghon dal nostro sistema immunitario. Il secondo caso, più raro in Italia, è molto rappresentato nei paesi ad alta endemia (27).

Lo spettro di manifestazioni sintomatiche della TB post – primaria abbraccia diversi quadri clinici, i più rappresentativi dei quali sono la tubercolosi miliare, una vera e propria sepsi tubercolare a partenza da un focolaio colliquato che si rompe in un vaso sanguigno o linfatico, quadri essudativi che sono i più frequenti (polmonite caseosa, broncopolmonite a focolai disseminati), e la tubercolosi cavitaria cronica (3).

Tubercolosi miliare

La tubercolosi miliare è una forma potenzialmente letale di tubercolosi post – primaria, nonostante si possa verificare anche come manifestazione primaria. La tubercolosi miliare aggrega circa 1-2 % di tutti i casi di tubercolosi e quasi l'8% di tutte le forme extrapolmonari negli individui immunocompetenti. La malattia si (27) incontra, però più frequentemente nei soggetti immunocompromessi. L'evento cruciale nello sviluppo di questa forma di TB post – primaria è una massiva disseminazione linfo – ematogena di *M. tuberculosis* da un focolaio polmonare o extrapolmonare e l'embolizzazione al letto vascolare di vari organi. Una generalizzazione durante la tubercolosi post primaria può essere rapidamente progressiva (ne risulta una TB miliare acuta), episodica o protratta, portando ad una tubercolosi miliare cronica. La tubercolosi miliare è, inoltre, una comune manifestazione della tubercolosi congenita neonatale. Da un punto di vista eziopatogenetico, l'alcolismo, la malnutrizione, le infezioni pediatriche, l'HIV, il diabete mellito, l'insufficienza renale grave, l'alloctrapianto, le connettivopatie, la gravidanza ed il puerperio, la presenza di neoplasie e l'assunzione di corticosteroidi, immunosoppressori, citotossici ed immunomodulatori sono tutti eventi che, compromettendo gravemente la risposta cellulare mediata, predispongono al verificarsi della tubercolosi miliare (31).

Poiché l'organismo in cui ha luogo la disseminazione è sensibilizzato e tende a limitare la lesione, il tubercolo, o granuloma, è il marchio istopatologico della tubercolosi miliare. Macroscopicamente i tubercoli miliari sono riscontrabili a livello dei polmoni e dei vari altri organi colpiti, come piccole lesioni puntate, di colore grigiastro, circolari e più o meno di

grandezza uniforme. Gli organi ad elevato flusso sanguigno, come la milza, il fegato, i polmoni, il midollo osseo, i reni e le ghiandole surrenali, sono più frequentemente coinvolti (3, 31).

Le manifestazioni cliniche sono mutevoli e aspecifiche: spesso la malattia insorge con febbre persistente, anoressia, calo ponderale, astenia e tosse. Di rado e soprattutto tra i soggetti anziani si ha una presentazione con apiressia ed astenia che mima il quadro di una lesione neoplastica: questa condizione viene descritta con il termine di tubercolosi miliare criptica. La forma acuta diffusa è, invece, la più grave, interessando non soltanto l'intero parenchima polmonare, ma molto spesso anche le meningi, con febbre elevata, continua o remittente, cianosi, frequente obnubilamento del sensorio, accentuata dispnea e spiccata tachicardia. I reperti radiologici possono essere suggestivi: la collezione di tenui opacità di dimensioni uniformi (circa 2 mm) ed a distribuzione omogenea al radiogramma del torace è patognomonica di tubercolosi miliare. Questo pattern manca nel 50% dei casi ed è sostituito da un'immagine normale o da lesioni più voluminose (3,27,31). La TC e la RMN hanno incrementato il tasso di diagnosi ante mortem di tubercolosi miliare: sono, infatti, in grado di individuare il classico quadro miliarico anche quando la radiografia del torace è normale e di identificare lesioni extrapolmonari, esercizio un tempo possibile solo a livello autoptico. L'ecografia può rivelare la presenza di lesioni focali epatiche o spleniche, ascessi ed ascite. Comuni riscontri di laboratorio sono l'anemia normocromica, la leucopenia o la leucocitosi, un'elevata velocità di eritrosedimentazione e l'iponatremia. L'intradermoreazione di Mantoux ha un'esigua utilità diagnostica perché, spesso, i pazienti affetti da tubercolosi miliare sono anergici. L'esame colturale dell'escreato, del lavaggio broncoalveolare, del materiale gastrico, del liquido cefalo rachidiano, dell'aspirato midollare e l'emocoltura possono essere necessari per la diagnosi. Le metodiche sierologiche (ricerca mediante ELISA di antigeni, anticorpi o immunocomplessi), biochimiche (determinazione dei livelli di ADA), immunologiche (IFN- γ) e molecolari (PCR) forniscono un valido aiuto, ma un loro risultato negativo non consente di escludere la tubercolosi miliare e la necessità di un trattamento (31). La mortalità determinata dalla tubercolosi miliare è pari circa al 15-20% tra i bambini ed al

25-30% negli adulti; fattore aggravante è il ritardo nella diagnosi e nell'introduzione della terapia.

Nei pazienti con infezione da HIV la tubercolosi miliare manifesta alcune peculiarità epidemiologiche e cliniche: il 10% di coloro che presentano una malattia polmonare ed il 38% di coloro che hanno un interessamento extrapolmonare sviluppano un quadro miliare. Sintomi costituzionali maggiori e febbre sono caratteristici. La radiografia del torace è patologica nell'80% dei casi e può presentare le tipiche lesioni. Solo il 10% di questi pazienti

è positivo alla prova tubercolinica. La coltura dell'escreato è positiva solo nel 25% dei casi ma colture di altri materiali, tra cui il sangue, possono essere positive dal 50 al 60% dei casi (31). Le biopsie hanno le tipiche apparenze istologiche della TB ma con un più elevato numero di microrganismi acido resistenti rispetto ai pazienti non HIV affetti da TB miliare (32).

Quadri essudativi

La più comune manifestazione di tubercolosi post primaria è l'*infiltrato precoce di Assman*. Si tratta di un processo tubercolare circoscritto, a sede retro o sottoclaveare; esordisce come nodulo ma mostra una spiccata tendenza alla colliquazione ed all'escavazione. Può associarsi ad una reazione essudativo-nodulare a carico di tutto il lobo (lobite). I sintomi di esordio sono molto variabili: in alcuni pazienti la patologia si rivela con emottisi solo dopo la formazione di una caverna, in altri precocemente compaiono disturbi simil-influenzali (astenia, anoressia, iperpirressia, sudorazioni). In caso di lobite il paziente riferisce un tipico dolore toracico sordo e profondo, dovuto all'interessamento della pleura scissurale.

Di raro riscontro, la *polmonite caseosa* indica la presenza di lesioni caseose a carico di un intero lobo polmonare. Ha inizio brusco con febbre elevata e stato tossiemico. Se non trattata, ha un'evoluzione rapidamente fatale.

La malattia tubercolare post primaria potrebbe rivelarsi anche come una *broncopolmonite a focolai disseminati*. I focolai tendono in breve tempo a confluire ed a escavarsi (tisi galoppante). Ha un esordio acuto con febbre elevatissima, compromissione dello stato generale, tosse, dispnea ed emottisi. Il radiogramma del torace mostra addensamenti nodulari a distribuzione irregolare e margini sfumati: diviene, quindi, necessaria la diagnosi differenziale da broncopolmoniti batteriche aspecifiche e da secondarismi polmonari (3, 27).

Tubercolosi cavitaria cronica (tisi)

Rappresenta l'evoluzione dei processi colliquativi polmonari e suo elemento patognomico è la caverna. I reperti obiettivi e radiologici sono estremamente variabili. Nei pazienti immunocompetenti l'espettorato è sempre positivo per *M. tuberculosis* (3).

Tubercolosi Extra-polmonare

Nell'era precedente l'avvento della pandemia da HIV, e negli studi coinvolgenti adulti immunocompetenti, è stato osservato che le forme di TB extrapolmonare costituivano tra il 15 e il 20% di tutti i casi di TB. Nei pazienti sieropositivi per HIV, la tubercolosi extrapolmonare annovera più del 50% dei casi totali.

I pazienti con TB extrapolmonare manifestano, in genere, sintomi costituzionali, quali febbre, anoressia, perdita di peso, malessere e astenia, ai quali si sommano sintomi e segni organo – specifici, a seconda dell'apparato coinvolto. I siti anatomici più comunemente interessati dalla malattia sono i linfonodi, il sistema nervoso centrale, l'apparato osteo – articolare, l'apparato genito – urinario e gastroenterico. Meno comuni sono, invece, le sierositi (pleuriti, pericarditi, peritoniti), la surrenalite e la tubercolosi oculare (3,27).

Tubercolosi linfonodale

La tubercolosi linfonodale è storicamente la forma di tubercolosi extrapolmonare più frequente. E' generalmente la manifestazione locale di una micobatteriosi sistemica, ma, in taluni casi, può rappresentare l'unica localizzazione di malattia. Benchè fosse originariamente considerata malattia dell'infanzia, la linfadenite è massimamente rappresentata nella fascia di età compresa tra i 20 e i 40 anni; negli USA è soprattutto presente fra le donne e gli immigrati (33).

Si manifesta, classicamente, con la comparsa di una tumefazione non dolente, più comunemente in sede cervicale, ma tutte le stazioni linfonodali periferiche, inguinali, ascellari, mesenteriche, mediastiniche e intramammarie, possono essere coinvolte. Nei pazienti sieropositivi per HIV la linfadenopatia tubercolare si manifesta generalmente con distribuzione multifocale, si accompagna ad astenia, febbre e calo ponderale, coinvolge spesso le stazioni linfonodali mediastiniche ed intraddominali e può essere associata a segni di malattia in altre aree del corpo (principalmente parenchima polmonare) (34,35).

La linfadenopatia tubercolare periferica può essere suddivisa in cinque stadi:

- *Stadio I*: linfonodi modicamente aumentati di volume, di consistenza parenchimatosa e mobili sul piano superficiale e profondo, che mostrano una iperplasia reattiva aspecifica.
- *Stadio II*: grandi linfonodi di consistenza gommosa, fissati al tessuto circostante con peradenite.
- *Stadio III*: rammollimento della sede centrale dei linfonodi per processo di caseificazione.
- *Stadio IV*: sviluppo di ascesso tipo “collar stud”.
- *Stadio V*: formazione di tratti fistolosi drenanti l'ascesso (34).

La diagnosi viene stabilita mediante esame microscopico diretto, coltura ed esame istologico del materiale prelevato (ago aspirato, biopsia), che, nelle fasi precoci, permettono la differenziazione da altre linfopatie, come toxoplasmosi, malattia da graffio di gatto e linfomi (34,35).

Pleurite tubercolare e Empiema tubercolare

La pleurite tubercolare è classificata fra le tubercolosi extrapolmonari, nonostante l'intimo rapporto anatomico tra i polmoni e la pleura (34), tanto che nel 20% dei casi è evidenziabile nel contesto anche una lesione polmonare.

Il coinvolgimento pleurico è riscontrabile nel 5% di tutti i casi di tubercolosi e l'infezione da *M. tuberculosis* è la più frequente causa di pleurite. Un versamento pleurico può conseguire alla rottura di un focolaio polmonare, sia parenchimale che linfonodale, nell'ambito della tubercolosi post-primaria, cronica e miliare (34,35,36). Il coinvolgimento pleurico si presenta generalmente come una malattia acuta e la durata dei sintomi varia da pochi giorni a qualche settimana. Per lo più i pazienti lamentano un dolore toracico pleuritico, tosse non produttiva e dispnea. La febbre si presenta in molti pazienti, non in tutti. A volte l'esordio è sfumato, con moderato dolore toracico, febbricola, tosse, perdita di appetito e di peso. (34)

Il versamento è unilaterale, tranne nelle forme associate a tubercolosi miliare. Nel 20% dei casi c'è una concomitante lesione polmonare. Il liquido pleurico contiene 500-2500 leucociti su mmc, il 90% dei quali sono linfociti. Il contenuto proteico è superiore a 2.5 g/dl, il glucosio è inferiore ai valori sierici, ma raramente inferiore a 20 mg/dl, il pH è sempre pari o inferiore a 7,3. Nel caso di una pleurite postprimaria precoce con versamento la ricerca di bacilli alcol acido resistenti è raramente positiva, la coltura è positiva nel 25-30% dei casi e l'ago biopsia della pleura evidenzia granulomi nel 75% dei casi. Marcatori biochimici come l'adenosina deaminasi (livelli elevati di adenosina deaminasi nel liquido pleurico sono altamente specifici), l'interferone γ ed il lisozima possono essere utili per la diagnosi. L'esame radiologico mette in evidenza un'opacità più o meno densa a seconda dell'entità del versamento (3).

Questa condizione si risolve spontaneamente nell'arco di 2-4 mesi. La terapia non affretta la risoluzione ma impedisce lo sviluppo di malattia attiva in altre regioni dell'organismo, evento che altrimenti si verificherebbe in due terzi dei casi.

L'empiema tubercolare si sviluppa quando una cavità di grandi dimensioni si rompe nello spazio pleurico. Questa grave condizione è associata spesso alla formazione di una fistola tracheobronchiale. Prima che fossero disponibili i farmaci antitubercolari l'empiema tubercolare era rapidamente fatale (35).

Pericardite tubercolare

La pericardite tubercolare si sviluppa secondariamente a diffusione per contiguità dai linfonodi mediastinici, dai polmoni, dalla colonna vertebrale, o dallo sterno, oppure durante una disseminazione miliare (35). In alcune casistiche la letalità di questa forma polmonare

raggiunge il 40% (27). La pericardite tubercolare colpisce più comunemente dalla terza alla quinta decade di vita. La malattia ha un esordio insidioso, manifestandosi con febbre, malessere e debolezza. I pazienti possono presentare sfregamenti pericardici, indistinto dolore toracico o cardiomegalia alla radiografia. Nel 20% dei casi compare in maniera acuta e in alcuni casi la prima manifestazione è quella del tamponamento cardiaco. Dispnea, tosse e perdita di peso sono i sintomi più comuni. Dolore toracico, ortopnea ed edemi declivi capitano nel 40 – 70% dei pazienti (34).

Tubercolosi cerebrale

Nonostante la disponibilità di una terapia antimicrobica efficace, la meningite tubercolare continua ad esercitare un ruolo devastante nei paesi in via di sviluppo ed in quelli industrializzati. Costituisce circa il 5% dei casi extrapulmonari di tubercolosi, si osserva più spesso nei bambini piccoli, ma si può sviluppare anche negli adulti, specialmente quelli con infezione da HIV, nei quali consegue spesso alla riattivazione di focolai subcorticali o meningei quiescenti.

Le nostre conoscenze sulla patogenesi della meningite tubercolare derivano dal meticoloso lavoro di Rich e McCordock condotto negli anni '20. Essi dimostrarono che le meningi non possono essere infettate direttamente per diffusione ematogena; in seguito, attraverso indagini autoptiche, misero in evidenza la presenza di focolai subcorticali e meningei a partire dai quali i bacilli raggiungono lo spazio subaracnoideo. La rottura potrebbe fare seguito ad un trauma cranico o potrebbe essere associata ad una compromissione immunitaria. Si forma, quindi, un denso essudato, più abbondante nella fossa interpeduncolare e nella regione soprassellare; questo essudato circonda le arterie ed i nervi cranici, ostruendo il flusso del liquor: da qui lo sviluppo di idrocefalo. Molto grave è l'insorgenza di vasculite a livello del circolo di Willis e dei rami perforanti dell'arteria cerebrale media: ne risultano emiplegia e quadriplegia (37).

La malattia insorge con un periodo prodromico caratterizzato da malessere, cefalea intermittente e febbre continua, a distanza di due o tre settimane, dalla comparsa di febbre continua, vomito, alterazione dello stato di coscienza, meningismo e segni neurologici focali. Lo spettro dei quadri clinici è ampio, andando da cefalea cronica o lievi alterazioni della coscienza fino ad un'improvvisa meningite con coma. La febbre potrebbe essere assente e la conta leucocitaria normale. Evidenze di una concomitante tubercolosi extrameningea sono presenti in tre quarti dei casi. La pietra d'angolo per la diagnosi è l'esame del liquor: la conta cellulare va da 0 a 1500/mmc, la protidorrachia è elevata (> 0.8 g/L) e la glicorrachia bassa. È tipica la predominanza dei linfociti anche se negli stadi iniziali si potrebbe osservare una

pleiocitosi determinata da polimorfonucleati. Il quadro liquorale può peggiorare anche a distanza di 10-14 giorni dall'inizio della terapia: questo riscontro è di aiuto nella diagnosi differenziale da altre meningiti batteriche. L'identificazione dei bacilli spesso richiede l'esame di elevati volumi da ripetute punture lombari (38). La PCR può essere molto utile a questo proposito anche se sono stati riportati falsi negativi (39,40). Attualmente sono state sviluppate nuove tecniche di PCR su liquor al fine di incrementarne sensibilità e specificità; sono degne di nota la NESTED PCR (PCR con primer annidati) e il saggio WR-QNTR-PCR, metodo diagnostico rapido, ma non ancora ampiamente utilizzato nella routine clinica (41).

La TC e la RMN del cranio hanno rivoluzionato la diagnosi e il management della malattia, ma queste metodiche di indagine possono essere normali nelle prime fasi della malattia. La prognosi è influenzata dall'età, dalla durata dei sintomi e dai deficit neurologici. La mortalità è più elevata sotto i 5 anni o sopra i 65 anni di età e nei pazienti in cui i sintomi sono presenti da più di due mesi. La stadiazione clinica è condotta in base alle condizioni neurologiche.

L'interessamento del SNC da parte di *M. tuberculosis* si può manifestare anche con la formazione di lesioni occupanti spazio dette tuberculomi. Queste lesioni sono molto spesso multiple, alle indagini radiologiche appaiono come masse avascolari circondate da edema e sono causa di crisi comiziali. L'infezione da HIV non sembra alterare le manifestazioni cliniche e di laboratorio, anche se le lesioni occupanti spazio sono più frequenti (37, 38).

Tubercolosi ossea

Nota più comunemente come morbo di Pott, la tubercolosi ossea è responsabile del 35% dei casi di tubercolosi extrapolmonare e coinvolge tipicamente il rachide. Un terzo dei casi di tubercolosi ossea coinvolge la colonna vertebrale come risultato di una diffusione ematogena, per contiguità o di una diffusione linfatica a partire da una malattia pleurica: a queste condizioni si dà il nome di spondilite tubercolare o malattia di Pott. Nei paesi in cui la tubercolosi è endemica il morbo di Pott colpisce soprattutto tra i giovani adulti, mentre nelle nazioni industrializzate è una patologia dell'anziano. La sede primitiva di malattia è l'angolo anteriore (superiore o inferiore) del corpo vertebrale. Da questa localizzazione la lesione si diffonde al disco intervertebrale ed alle vertebre adiacenti. La regione toracica della colonna è quella più spesso colpita, a seguire il tratto lombare, poi quello cervicale e da ultimo quello sacrale. In genere la tubercolosi non coinvolge altri organi e non ci sono sintomi sistemici. I bacilli sono rari e l'esame microscopico e la coltura sono positive solo nella metà dei casi; l'esame istologico mette in luce granulomi con o senza caseificazione in tre quarti dei casi (3, 27, 28).

Tubercolosi addominale

la tubercolosi addominale può coinvolgere il tratto gastrointestinale, il peritoneo, i linfonodi mesenterici o il tratto genito-urinario.

Tubercolosi gastrointestinale

Qualsiasi parte del tratto gastrointestinale può essere colpita dalla tubercolosi. Sono coinvolti diversi meccanismi patogenetici: la deglutizione dell'espettorato con conseguente disseminazione diretta, la diffusione ematogena o, raramente, l'ingestione di latte proveniente da mucche affette da tubercolosi bovina (27). I bacilli penetrano nella sottomucosa e infettano il tessuto linfoide della sottomucosa, determinando la formazione del tubercolo epitelioido. Le lesioni intestinali, che coinvolgono più frequentemente ileo e cieco, possono essere ulcerative (più comuni), ipertrofiche o ulcero – ipertrofiche. Le ulcere sono, di norma, piccole e multiple con margini irregolari e mucosa circostante ispessita; con la progressione della malattia si ha la formazioni di granulomi, la necrosi caseosa e cicatrizzazione.

I sintomi includono dolore addominale, diarrea, sudorazioni notturne, perdita di peso e iperpiressia. Possono anche essere presenti melena, ematochezia e distensione addominale. Una massa nel quadrante inferiore destro è palpabile nel 25 – 50% dei pazienti (35). La malattia può complicarsi con ostruzione, fistole, ascessi perirettali e fissurazioni anali.

Studi contrastografici con bario, colonscopia e TC addominale sono le metodiche più utilizzate nel processo diagnostico, ma la diagnosi definitiva è effettuata attraverso l'esame istologico e colturale dei campioni biotici prelevati durante manovre endoscopiche o laparoscopiche. Di fondamentale importanza è la diagnosi differenziale con il morbo di Crohn, in quanto l'introduzione erronea di una terapia immunosoppressiva potrebbe favorire la disseminazione del micobatterio (42).

Tubercolosi peritoneale

Nonostante il peritoneo sia raramente coinvolto da solo nell'infezione tubercolare, un suo interessamento è osservabile nell'ambito di tubercolosi addominali diffuse.

Il rischio di peritonite tubercolare è maggiore nei pazienti con infezione da HIV o cirrosi ed in coloro che vengono sottoposti periodicamente a dialisi peritoneale. nE' dovuta alla diffusione di una lesione tubercolare vicina, come può essere un linfonodo mesenterico, oppure si sviluppa nel corso di una tubercolosi miliare (34).

Sintomi comuni sono la febbre, il calo ponderale e le addominalgie. L'insorgenza è, di solito, subdola anche se la malattia potrebbe presentarsi in modo acuto come le più tipiche peritoniti batteriche. Il liquido peritoneale è essudatizio e contiene da 500 a 2000 cellule, soprattutto linfociti. La ricerca microscopica di bacilli alcol acido resistenti è raramente positiva e la

coltura è positiva solo nel 25% dei casi; la misurazione dei livelli di adenosina deaminasi nel liquido ascitico sembra avere buona sensibilità e specificità (43). La diagnosi definitiva è garantita solo dall'esame istologico del tessuto peritoneale ottenuto tramite laparoscopia o laparotomia.

Tubercolosi genito-urinaria

Nel corso di qualsiasi forma di tubercolosi possono svilupparsi dei focolai a livello della corticale del rene; questi foci tendono rimanere silenti fin tanto che non raggiungono la midollare. In un ospite immunocompetente l'intervallo tra l'infezione e lo sviluppo di una malattia renale attiva è di anni. E' una malattia dell'adulto e può essere associata a localizzazioni extra genitourinarie (3, 35).

Predominano i sintomi locali (disuria, ematuria e dolore) e la distruzione del tessuto può iniziare molto prima che venga posta la diagnosi. Non è accompagnata dallo sviluppo di ipertensione o di insufficienza renale. Solo nel caso della nefrite interstiziale tubercolare si verifica una compromissione della funzionalità renale.

La coltura di tre campioni di urine stabilisce la diagnosi nell'80% dei casi. Quando è presente un'anomalia renale ma le colture delle urine sono negative, gli esami citologico e colturale del materiale ottenuto mediante biopsia con ago sottile possono essere diagnostici.

La tubercolosi genitale maschile nell'80% dei casi è associata ad un coinvolgimento renale (44). L'infezione si diffonde dal rene alla prostata, alle vescicole seminali ed ai testicoli. Sono comuni il riscontro di una massa scrotale e lo sviluppo di persistente oligospermia. La diagnosi è molto spesso chirurgica e la risposta alla terapia ottima.

Nella donna, invece, la tubercolosi genitale inizia con un focolaio linfoematogeno a livello dell'endosalpinge, poi può raggiungere l'endometrio (50%), le ovaie (30%), la cervice uterina (10%) e la vagina (1%). Le pazienti lamentano infertilità, disordini mestruali ed addominalgie, rari sono i sintomi sistemici. La diagnosi è raggiunta attraverso l'esame istologico del tessuto rimosso per via chirurgica. La risposta alla terapia antitubercolare è eccellente (34,35).

Laringite tubercolare

Nell'epoca pre-antibiotica la tubercolosi laringea si sviluppava in un terzo dei pazienti che poi sarebbero morti per la malattia polmonare ed era spesso associata ad ulcere dolorose a livello dell'epiglottide, della faringe, delle tonsille, della bocca e dell'orecchio medio. Era una condizione molto contagiosa. Attualmente più della metà dei casi di tubercolosi laringea sono dovuti alla disseminazione ematogena. Le lesioni hanno una presentazione variabile

(eritema o masse esofitiche). I sintomi comprendono la tosse, l'emoftoe, la disfagia, l'odinofagia e l'otalgia.

Otite tubercolare

L'otite media tubercolare è infrequente e la metà dei soggetti affetti non ha evidenze di una passata o presente tubercolosi. Il quadro clinico classico è caratterizzato da otorrea indolente con numerose perforazioni timpaniche, esuberante tessuto di granulazione, precoce e grave perdita dell'udito e necrosi della mastoide. Questa patologia può essere complicata dalla paralisi del VII nervo cranico. La risposta alla terapia è buona e non è necessario alcun intervento chirurgico (28).

1.5 DIAGNOSI

La diagnosi di tubercolosi si basa su criteri microbiologici, radiologici e immunologici, premesso che il fondamento principale consiste nel sospetto clinico formulato in relazione a dati anamnestici, epidemiologici e semeiologici. E' importante sottolineare che la diagnosi di certezza si basa sull'isolamento in coltura di *M. tuberculosis*, che ad oggi rappresenta ancora *gold standard* nell'iter diagnostico della tubercolosi (3). I sintomi e i segni della tubercolosi dipendono dalla localizzazione e dall'estensione della malattia e variano in funzione dello stadio evolutivo.

Criteria microbiologici

Esame microscopico diretto

L'esame microscopico diretto per la ricerca di bacilli acido-alcol resistenti (BAAR) mediante colorazione di Ziehl-Neelsen o immunofluorescenza con auramina-rodamina applicabile a strisci di vari campioni biologici (espettorato, broncoaspirato, liquor, urine, feci) è il metodo più rapido per la identificazione dei micobatteri. Fornisce un risultato entro 24 ore, di tipo quantitativo utile per stimare la contagiosità del paziente (45). Tuttavia questo tipo di esame presenta alcuni inconvenienti come la scarsa sensibilità (compresa tra il 36 e il 46%) dell'esame microscopico tradizionale e l'incapacità di discriminare i diversi tipi di micobatteri. Per fornire una risposta positiva il test richiede la presenza di almeno 5.000 - 10.000 bacilli.

Per aumentare la sensibilità dell'esame è necessario compiere una raccolta seriata dei campioni biologici, quando possibile, sia in fase diagnostica iniziale sia in fase di monitoraggio dell'efficacia della terapia per valutare la negativizzazione dei medesimi. Nei pazienti con sospetto di tubercolosi polmonare, ma non in grado di produrre espettorati, oppure in quelli con esito negativo all'esame diretto, un espettorato indotto mediante aerosol di soluzione salina ipertonica permette di potenziare il rendimento dell'esame batteriologico. In alternativa deve essere effettuata una broncoscopia con raccolta di lavaggio bronco alveolare (BAL) e bronco aspirato (BA), oppure si può prelevare un aspirato di succo gastrico, soprattutto nei bambini piccoli e negli adulti allettato incapaci di fornire una espettorazione spontanea o indotta (46).

Esame colturale

La coltura batterica rimane l'esame *gold standard* come conferma laboratoristica di TB. L'esame colturale è 500 volte più sensibile del microscopico diretto e mette a disposizione un numero elevato di bacilli per ulteriori indagini, come i test di farmaco resistenza e la genotipizzazione.

I micobatteri sono caratterizzati da tempi di crescita in vitro molto lenti e il successo dell'esame colturale potrebbe essere inficiato dalla presenza di colonie di batteri a crescita rapida. Così, campioni biologici come l'espettorato sono trattati inizialmente con reagenti decontaminanti (per esempio idrossido di sodio 2%) per rimuovere i microrganismi che potrebbero falsare il risultato.

I batteri possono essere inoculati su terreni a base di uovo (Lowenstein – Jensen, Petreggiani) o agar (Middlebrook 7H10) e incubati a 37°C in atmosfera arricchita di CO₂ al 5%. Le colture richiedono almeno 21 giorni per produrre colonie visibili.

In ragione del lungo tempo richiesto e dei risultati frequentemente negativi nei campioni paucibacillari, sono state sviluppate negli ultimi anni nuove tecniche colturali in medium liquidi, tra le quali il sistema MGIT 960 (47,48). Si tratta di un metodo automatizzato, non radiometrico, che si basa sulla misurazione del consumo di ossigeno, mediante un sensore a fluorescenza ultravioletta, rilevabile in presenza di crescita micobatterica in vials di terreno liquido modificato Middlebroch 7H9. La crescita può essere rilevata già entro una settimana. Un altro sistema automatizzato, che tuttavia richiede materiale radioattivo, è il BACTEC 460 (47,48). Consiste in una procedura che prevede la coltivazione dei micobatteri in un terreno liquido contenente acido palmitico marcato con isotopi radioattivi. Dopo solo una o due settimane di crescita la presenza di micobatteri viene valutata misurando la CO₂, quindi si esegue il NAP test (beta nitro alfa acetilamina beta idrossi propriofenone) che inibisce selettivamente la crescita di *M. tuberculosis* e di *M. bovis* (27).

Il saggio colturale MODS (*Microscopic Observation Drug Susceptibility*) per la rilevazione di tubercolosi e tubercolosi multi resistente direttamente dallo sputo, è stato dimostrato più sensibile, più rapido e meno costoso rispetto ai *gold standard* (tecniche colturali automatizzate ed effettuate su Lowenstein – Jensen). Se una coltura è negativa al saggio MODS dopo il 15° giorno di incubazione, vi è una probabilità del 99,7% che si tratti di un vero negativo (49). Infine un altro recente metodo sperimentato è la tecnica colturale a strato sottile (TLA, *Thin Layer Agar*). La TLA utilizza un *medium* solido ed è basata sulla rilevazione microscopica precoce di crescita micobatterica, entro 9 -14 giorni. Il campione biologico viene inoculato in una piastra contenente Middlebrook 7H11 ed in una con

Middlebrook 7H11 arricchito con PNB (Acido para-nitrobenzoico), un inibitore di crescita micobatterica. Le due piastre verranno successivamente confrontate (50).

Tecniche molecolari

I limiti propri dell'esame microscopico e delle metodiche colturali (bassa sensibilità; prolungata incubazione) hanno promosso lo sviluppo di tecniche molecolari per individuare la presenza di *M. tuberculosis* nei campioni clinici. Tra la fine degli anni '80 e l'inizio degli anni '90 hanno così visto la luce le prime tecniche di amplificazione degli acidi nucleici. Esse prevedono la processazione del campione, l'amplificazione di una sequenza target mediante specifici *primers* ed infine l'ibridizzazione con una sequenza complementare. Nella ricerca del bacillo tubercolare le sequenze amplificate sono rappresentate dai geni codificanti per antigeni di 32, 38 o 65 kDa oppure dai geni *dnaJ*, *groE1* e *mtb-4*. Le sequenze più utilizzate sono, però, IS986 e IS6110, elemento ripetitivo presente in multiple copie nella maggior parte dei ceppi di *M. tuberculosis complex*.

Le tecniche molecolari presentano degli indubbi vantaggi:

- sono molto sensibili, potendo individuare la presenza di 1-10 micobatteri in un campione;
- hanno un'elevata specificità;
- sono direttamente applicabili a campioni clinici di diversa natura;
- forniscono velocemente i risultati con una riduzione del tempo necessario per la diagnosi da una media di 37,5 a 22 giorni (51);
- consentono di individuare i micobatteri, identificarne la specie (attraverso l'uso di sonde radiomarcate o marcate con molecole fluorescenti oppure attraverso il sequenziamento) e valutarne la farmacoresistenza. Alla base di quest'ultima applicazione c'è la considerazione che nella maggior parte dei casi la farmacoresistenza è dovuta a mutazioni nei geni che codificano per i bersagli dei farmaci (52,53).

Allo stesso tempo, però, presentano anche evidenti limiti:

- la loro accuratezza diagnostica varia a seconda dei preparati commerciali utilizzati. Una metanalisi condotta da Cho rivela che nei campioni positivi all'esame microscopico, la sensibilità varia da 0,96 a 0,98, mentre la specificità da 0,71 a 0,96. Per i campioni, nei quali la ricerca batterioscopica di bacilli alcol acido resistenti è risultata negativa, la sensibilità è compresa tra 0,57 e 0,76, mentre la specificità oscilla tra 0,97 e 0,99;

- fattori confondenti quali la natura e la quantità del campione, i metodi ed il tempo di conservazione prima della processazione, la procedura, la presenza di inibitori, le contaminazioni crociate tra campioni possono influenzare i risultati, dando luogo a falsi positivi o falsi negativi;
- non sono in grado di discriminare tra micobatteri vivi ed uccisi, il che può portare a risultati discordanti da quelli ottenuti per via batterioscopica;
- hanno costi elevati.

Attualmente disponiamo di tecniche di amplificazione degli acidi nucleici a variazione ciclica della temperatura (*Polymerase Chain Reaction* e *Ligase Chain Reaction*) e tecniche isoterme (*Transcription Mediated Amplification*, *Q-beta replicase amplification* e *Strand Displacement Amplification*). Queste ultime rappresentano un ulteriore passo in avanti (54).

Ove disponibile, la reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di evidenziare rapidamente (entro 24 ore) la presenza nei campioni biologici anche di pochissimi micobatteri, tramite l'amplificazione del DNA di *M. tuberculosis*. E' un'applicazione della capacità della DNA polimerasi di sintetizzare in vitro fino a dieci copie di qualsiasi segmento specifico di DNA, per il quale siano disponibili degli oligonucleotidi di sintesi (primers) complementari alle estremità 5' e 3' che fiancheggiano il segmento stesso. La reazione utilizza la ripetizione di tre fasi che si svolgono in diverse condizioni di temperatura. Nella prima fase, detta di denaturazione, la sequenza di DNA viene denaturata al calore mediante incubazione ad alta temperatura; nella seconda fase, detta di ibridazione, che si svolge ad una temperatura sensibilmente più bassa, i *primer* ibridano i filamenti stampo ai quali sono complementari; nella terza fase, detta di estensione, che avviene alla temperatura ottimale per l'attività enzimatica, la DNA polimerasi sintetizza una catena complementare a quella originale a partire da ciascun *primer* ibridato alla sequenza stampo complementare che funge da innesco per la sintesi. Mediante la ripetizione dei cicli di denaturazione, ibridazione dei primer ed estensione ad opera della DNA polimerasi, si ottiene un processo di amplificazione esponenziale della sequenza di DNA bersaglio originariamente presente nel campione. La reazione di PCR ideata da Mullis e collaboratori nel 1984 utilizzava per l'estensione il frammento di Klenow di una DNA polimerasi di *E.coli*, che funziona alla temperatura ottimale di 37°C e si inattiva alle alte temperature necessarie per la denaturazione della doppia elica. Questo richiedeva l'aggiunta di un nuovo enzima ad ogni ciclo dopo la denaturazione. Successivamente è stata introdotta una DNA polimerasi estratta dal batterio *Thermus aquaticus*, la Taq polimerasi, che è stabile ed attiva a temperature elevate ed ha consentito di impostare dei protocolli analitici completamente automatizzati. In campioni di espettorato positivi all'esame colturale la sensibilità e la specificità della PCR per *M.*

tuberculosis sono superiori al 95%; in campioni negativi la specificità è analoga ma la sensibilità è del 40-77% (55). La sua efficacia dipende da diversi parametri di amplificazione quali la concentrazione del DNA, le dimensioni del frammento che deve essere amplificato ed il numero di ripetizioni di tale frammento. La specificità del processo di amplificazione dipende dalla scelta dei *primer* (56).

- a. La reazione a catena della ligasi (LCR) è una variante della PCR. E' potenzialmente utile per lo screening di persone ad alto rischio di sviluppare la tubercolosi. Come la PCR, è basata su una variazione ciclica della temperatura; una ligasi termostabile è usata per unire due sonde che sono complementari alla sequenza bersaglio di DNA. Ha alta sensibilità e specificità per i campioni sia positivi sia negativi all'esame microscopico. L'uso di questa tecnica è limitato dal costo elevato.
- b. Tra le metodiche di amplificazione degli acidi nucleici isotermiche possiamo ricordare la TMA (*Transcription Mediated Amplification*): mima la replicazione retrovirale e, diversamente dalla PCR, può usare come stampo sia l'RNA che il DNA. Il limite inferiore per il riconoscimento è rappresentato da 100 microrganismi. Può essere eseguita in un'unica provetta: questo minimizza la manipolazione del campione e la possibilità di contaminazione in laboratorio (57).
- c. Nella metodica conosciuta come *Q-beta replicase amplification* l'enzima Q-beta replicasi è usato per produrre RNA nella reazione di amplificazione ad una temperatura determinata. Gli inibitori della PCR non sembrano influenzare questo sistema.
- d. La SDA (*Strand Displacement Amplification*) è un'elegante strategia fondata su un'estensione guidata dalla DNA polimerasi e mediata dall'inclusione di siti di restrizione (57)

Criteria Radiologici

Le indagini radiologiche supportano e spesso confermano un sospetto clinico di tubercolosi. Nell'ambito delle forme a localizzazione polmonare la radiografia standard del torace è una metodica poco costosa, di rapida esecuzione e sufficientemente sensibile ad evidenziare le lesioni tubercolari. Il quadro radiografico definito tipico contempla, nelle cosiddette forme post-primarie, opacità, escavazioni, infiltrazioni dei lobi superiori, tipicamente sotto-claveari, o dei segmenti apicali dei lobi inferiori. E' necessario tuttavia considerare che le alterazioni radiografiche non sono patognomoniche di tubercolosi ma altamente suggestive e sempre da correlare con i dati clinici e microbiologici disponibili. Quadri radiologici cosiddetti atipici, ovvero intertiziopatia, addensamenti medio basali, linfadenopatie ilari e mediastiniche,

assenza di lesioni escavate e quadri radiologici negativi, sono di frequente riscontro nei soggetti immunodepressi HIV positivi, nei quali l'alterazione dell'immunità sovverte anche il tipo e la localizzazione delle lesioni polmonari. A completamento diagnostico può essere di ausilio la TC del torace a strato sottile per meglio caratterizzare le alterazioni del parenchima. La valutazione dell'interessamento linfonodale richiede l'impiego del mezzo di contrasto. Per quanto riguarda le forme a localizzazione extra-polmonare (addominale, SNC, genito-urinaria, linfonodale) si potranno impiegare le metodiche radiologiche, quali TC, RM o ecografia, più adeguate a seconda del distretto interessato.

Criteria immunologici

L'esposizione a *M. tuberculosis* genera una forte risposta immunitaria cellulo-mediata e, conseguentemente, la somministrazione intradermica di un antigene tubercolare dà luogo ad una reazione di ipersensibilità ritardata in un individuo precedentemente esposto. L'acquisizione dello stato di ipersensibilità verso *M. tuberculosis* viene verificata con le prove tubercoliniche che documentano semplicemente l'avvenuto contatto dell'organismo con il bacillo di Koch. I test cutanei tubercolinici (TST, Tuberculin Skin Test) consistono nell'impiego di sostanze (tubercoline) costituite da antigeni batterici e hanno una notevole importanza sia nel campo diagnostico che in quello epidemiologico, ad esempio per rilevare l'entità dell'endemia tubercolare in una determinata popolazione. Il TST può essere eseguito mediante tecniche diverse, quali la cutireazione (scarificazione cutanea su cui si deposita una goccia) e la cerottoreazione (applicazione di un cerotto su cui si è fatta essiccare la tubercolina) (3). La più impiegata in clinica è l'intradermoreazione di Mantoux, che consiste nell'iniezione intradermica di 0,1 ml della diluizione di tubercolina prescelta. La *tubercolina di Koch*, attualmente caduta in disuso, era il prodotto estratto da una coltura di bacilli tubercolari portata ad ebollizione. Nel 1934 Siebert sintetizzò un precipitato proteico purificato della vecchia tubercolina (il *PPD*, purified protein derivate, è un insieme di più di 200 diverse proteine di *M. tuberculosis*), che è divenuto il reagente di scelta nella maggior parte del mondo (Mendell, 1f). Per le indagini di routine si inoculano 5U di PPD e si esegue la lettura dopo 48-72 ore. La reazione viene considerata positiva se compare un infiltrato locale di almeno 10 mm di diametro (5 mm nei pazienti immunocompromessi) (Fig. 10). Nel 70-80% dei soggetti precedentemente infettati da *M. tuberculosis* l'inoculazione risulta positiva, sfortunatamente il test si caratterizza per una bassa sensibilità nei soggetti immunodepressi. Infatti, nei pazienti con tubercolosi in corso di infezione da HIV la reazione intradermica al PPD è positiva solo nel 40-70% dei casi, percentuale che scende ulteriormente all'11-60% nei pazienti con AIDS (27,28,59). Questa indagine, inoltre, è

gravata da una scarsa specificità come dimostrato dalla reazione di falsa positività in soggetti vaccinati con il bacillo di Calmettè-Gurèrin (BCG) ed in caso di esposizione a micobatteri ambientali. In aggiunta, consente solo la diagnosi di infezione e non di malattia tubercolare attiva, fattore che limita l'utilità diagnostica del test, soprattutto nei paesi con elevata endemia di TB.



Figura 10 lettura dell'intradermoreazione al PPD a 48h che evidenzia un'area di indurimento di 18 mm e un'eritema di 51 mm (fig. A), colorazione EE di reperto biotipico cutaneo effettuato al centro del ponfo che evidenzia intensa reazione peri-vascolare con macrofagi, linfociti ed edema coinvolgente il derma (fig. B).

Alternativo alla prova tubercolinica, il *TB MPB 64 patch test* utilizza MPB 64, un antigene specifico per *M. tuberculosis complex*. La lettura viene eseguita a 3-4 giorni di distanza dall'applicazione del cerotto. Ha una buona sensibilità (98.1%) e specificità (100%), ma finora è stato utilizzato solo nelle Filippine (60).

Alla fine degli anni '90 venne identificato nel genoma di *M. tuberculosis* un segmento assente in tutti i ceppi di BCG e nella maggior parte dei micobatteri ambientali. Due proteine codificate da questo frammento di DNA, ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target-6) e CFP-10 (Culture Filtrate Protein-10), sono importanti bersagli delle cellule Th1 nei pazienti con infezione tubercolare. La risposta cellulo-mediata a questi antigeni costituisce uno specifico marcatore dell'infezione tubercolare: su questo presupposto si fondano due nuovi tests ematici. Il primo, detto ELISpot (Enzyme Linked Immunospot Assay), valuta i linfociti T specifici per gli antigeni considerati. Le cellule T di individui con un'infezione tubercolare sono sensibilizzate in vivo a ESAT-6 e CFP-10; quando i linfociti T incontrano nuovamente questi antigeni *ex vivo* durante il test, rilasciano IFN- γ a cui consegue la formazione di un punto

nero, che è il marcatore di una cellula T specifica per *M. tuberculosis*. Sono quindi conteggiati i punti neri (58).

Un metodo alternativo è il QuantiFERON basato sulla tecnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay): misura la concentrazione di IFN- γ nel supernatante di un campione di sangue diluito dopo 24 ore di incubazione con ESAT-6 e CFP-10. Queste due tecniche sono complessivamente conosciute come *T cell-based IFN- γ Release Assay* (TIGRA). Gli studi finora condotti mostrano che entrambi i test sono ristretti per *M. tuberculosis* (non c'è alcuna reazione crociata con BCG): la loro specificità è, quindi, superiore a quella di TST; inoltre sono più sensibili della prova tubercolinica nel caso di una tubercolosi attiva. Un'elevata specificità consentirebbe di evitare trattamenti non necessari in persone vaccinate con BCG ma non infettate, le quali hanno dei risultati falsamente positivi al TST. Un'alta sensibilità permetterebbe di instaurare una terapia preventiva nei pazienti infetti ad alto rischio di progressione verso una malattia attiva, i quali spesso presentano una prova tubercolinica falsamente negativa a causa della compromissione dell'immunità cellulo- mediata. E' stato proposto l'utilizzo di ELISpot per monitorare gli esiti del trattamento, dal momento che l'intensità delle risposte ottenute con questa metodica declina con la terapia sia nell'infezione latente che nella malattia attiva (61,62,63,64). Alcuni studi hanno osservato che la misurazione simultanea della secrezione di IL-2 e IFN- γ da parte di linfociti T specifici per *M. tuberculosis* correla con la terapia: nuove metodiche in grado di valutare entrambe le citochine potrebbero essere di valido aiuto in clinica (65). Comunque, allo stesso modo della prova tubercolinica, i TIGRA non sono in grado di distinguere tra loro una tubercolosi attiva, una infezione latente ed una tubercolosi trattata se vengono eseguiti solo su cellule mononucleate ematiche. Il fatto che non sia possibile differenziare queste tre infezioni tubercolari non sorprende, dal momento che solo una piccola quota dei linfociti specifici si trova nel sangue periferico. Nella malattia attiva i linfociti T si localizzano soprattutto nel sito di infezione e non nel sangue periferico. Quindi, il confronto tra risposta immunitaria specifica per *M. tuberculosis* a livello locale e la stessa risposta a livello sistemico è una tecnica promettente per distinguere la TB attiva da un'infezione latente (66). Considerando, infine, che l'infezione è un prerequisito per lo sviluppo della patologia, l'alta sensibilità di questi test aiuta ad escludere la diagnosi di TB attiva in presenza di un risultato negativo (67,68).

Ulteriori applicazioni immunologiche alla diagnosi della tubercolosi sono la ricerca di antigeni ed anticorpi specifici. La dimostrazione di antigeni specifici per *M. tuberculosis* fornisce un'evidenza diretta dell'infezione. I limiti di questo approccio sono la bassa sensibilità, dovuta alla scarsità di antigeni tubercolari in alcuni liquidi corporei (liquor,

liquido pleurico, il sangue e le urine) e la limitata specificità (l'antigene più sfruttato, lipoarabinomannano, non è specifico potendosi riscontrare anche in altri micobatteri). I criteri che un antigene dovrebbe soddisfare sono l'abbondanza, la stabilità durante la processazione del campione e la specificità per *M. tuberculosis*. Le tecniche più usate sono sandwich-ELISA e dot-ELISA (53).

1.6 TERAPIA

Trattare la tubercolosi apporta benefici incommensurabili non solo al singolo individuo, ma all'intera comunità che ospita il malato. Così, ciascun medico che adotta i provvedimenti necessari per curare un paziente affetto da tubercolosi, sia che egli lavori nell'ambito della sanità pubblica, sia nella pratica privata, sta assolvendo una funzione di tutela della salute pubblica. Tale ruolo include la responsabilità non solo di prescrivere un adeguato regime terapeutico, ma anche di assicurarsi l'aderenza del paziente alla terapia fino a che non sia stata conseguita la guarigione (69).

L'era moderna della tubercolosi coincide proprio con la scoperta nel 1946 dell'efficacia della streptomina, seguita nel 1952 dall'isoniazide e della rifampicina negli anni Settanta: nacque così la cosiddetta *short course therapy* (28), che ha radicalmente trasformato la prognosi e l'evoluzione della tubercolosi. Nel 1993 fu unanimemente riconosciuto che la *short course therapy* per la tubercolosi possedeva un ottimo rapporto costo – beneficio. Cogliendone l'opportunità, l'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS o WHO) formulò e promosse la strategia DOTS (*Directly Observed Therapy, Short-course*), un nuovo approccio che rientrò ai primi punti nell'agenda della salute pubblica. I punti nevralgici di questo programma sono:

- l'impegno da parte dei governi nel sostenere le attività di controllo della patologia;
- l'identificazione dei casi mediante analisi microscopica diretta degli escreti nei pazienti sintomatici;
- l'applicazione di un regime di trattamento standard (6 o 9 mesi), per almeno tutti i casi positivi all'esame microscopico diretto dell'escreto, con osservazione diretta dell'assunzione dei farmaci prescritti per i primi due mesi di terapia;
- una regolare ed ininterrotta somministrazione dei farmaci anti-TB essenziali;
- la presenza di un sistema di raccolta dati e registrazione che permetta di valutare gli esiti dei trattamenti e quindi l'efficacia globale del programma di controllo.

I benefici della strategia DOTS sono evidenti: alla fine del 2004 più di 20 milioni di persone nel mondo erano state trattate all'interno di questo programma e 16 milioni erano state guarite (21).

Tuttavia, tale strategia terapeutica non risulta efficace verso i ceppi resistenti a più linee antibiotiche (MDR e XDR), che continuano ad essere sempre più frequenti e necessitano di un appropriato regime farmacologico valutato sui test di antibiotico resistenza. L'epidemia da HIV contribuisce a rafforzare questo nuovo quadro globale (70).

Negli ultimi anni l'attenzione verso il problema non si è certo ridotta, nel 2005 è stata stesa la *STOP TB strategy*, che si articola in sei punti fondamentali:

- 1) garantire l'espansione ed il miglioramento dei programmi DOTS (aumento dei finanziamenti, diagnosi dei casi mediante strumenti di alta qualità, trattamenti standardizzati, favorire l'accesso alle cure);
- 2) prestare attenzione alla confezione TB/HIV ed allo sviluppo di farmacoresistenza;
- 3) rafforzare i sistemi sanitari;
- 4) coinvolgere tutti coloro che operano in campo sanitario (sia strutture pubbliche che strutture private);
- 5) dare voce e sostenere i malati e le loro comunità;
- 6) promuovere la ricerca.

I contorni e le sfumature degli sforzi globali nell'affrontare questa pandemia sono da sempre sottoposti a variabili biologiche ed a determinanti sociali. La complessità del problema richiede fondi economici alla ricerca e la continua implementazione dei programmi di lotta alla tubercolosi, che si possono realizzare non solo a livello individuale, ma anche grazie alla compartecipazione di tutti coloro che lavorano nell'ambito della salute pubblica (21).

Terapia della tubercolosi attiva

La terapia antitubercolare ha come caratteristica principale quella di essere una terapia di associazione tra più farmaci e protratta per un lungo periodo data la lenta moltiplicazione dei micobatteri. Gli obiettivi del trattamento sono: curare i pazienti e ristabilire la loro qualità di vita e la loro produttività, ridurre il rischio di morte o di complicanze da tubercolosi, prevenire le riattivazioni, ridurre il rischio di trasmissione, prevenire lo sviluppo e la trasmissione di forme MDR.

Vi sono 10 farmaci antitubercolari attualmente approvati dalla FDA degli Stati Uniti (*Food and Drugs Administration*), dei quali cinque compongono la prima linea terapeutica. A questo gruppo appartengono i farmaci dotati di migliore efficacia e ridotta tossicità: isoniazide (INH) e rifampicina (RIF), farmaci cardine della terapia antitubercolare e dotati di potente attività battericida, etambutolo (EMB), batteriostatico, pirazinamide (PZN), ad attività battericida sui bacilli tubercolari intracellulari e streptomina, attiva contro i bacilli in rapida replicazione nel distretto extracellulare. I farmaci di seconda linea, invece, possiedono una minore specificità, efficacia e tollerabilità; devono pertanto essere utilizzati nei pazienti resistenti o intolleranti alla terapia di prima linea. Questi farmaci sono: rifabutina, capreomicina, amikacina, kanamicina, acido paraminosalicilico (PAS), cicloserina, etionamide, tiacetazone, i fluorochinoloni ed alcuni β lattamici. Presentano meccanismi di azione diversi ed una diversa capacità di azione nei tre compartimenti: extracellulare

metabolicamente attivo, intracellulare relativamente inattivo ed un terzo localizzato all'interno della sostanza caseosa.

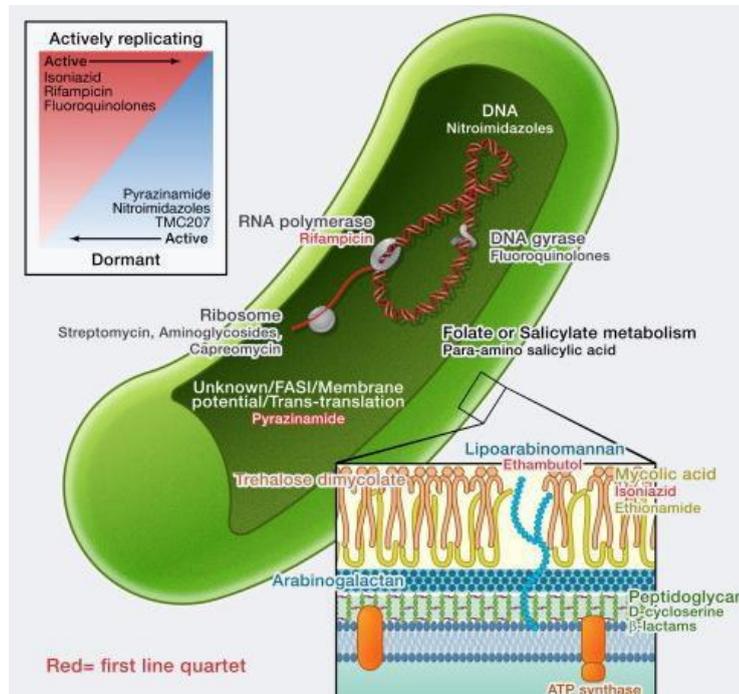


Figura 11 farmaci antitubercolari e loro principali target terapeutici

Le linee guida internazionali suggeriscono diversi regimi di trattamento, la cui scelta deve essere effettuata in base alla tipologia del caso, alla forma clinica e alla sensibilità farmacologica. L'OMS raccomanda un regime iniziale di sei mesi con rifampicina, isoniazide, pirazinamide ed etambutolo per 2 mesi, seguito da rifampicina e isoniazide per 4 mesi (71). Anche il regime terapeutico suggerito dal *Center for Disease Control* di Atlanta comprende una fase iniziale della durata di 2 mesi con INH, RIF, PZA ed EMB, seguita da una scelta fra diverse opzioni per la fase continuativa dalla durata di 4 o 7 mesi (69).

In associazione con altri 3 antitubercolari principali, la pirazinamide permette di abbreviare la durata del trattamento. La rifampicina dovrebbe essere utilizzata sempre per 6 mesi nei pazienti che presentano una nuova infezione da *M. tuberculosis*. La penetrazione degli antitubercolari nelle meningi e nel liquido cefalorachideo non è sempre adeguata. È buona nel caso di isoniazide e pirazinamide, meno per rifampicina ed etambutolo, che penetrano soprattutto quando le meningi sono infiammate, ossia negli stadi precoci della malattia. Il regime terapeutico sopraindicato viene consigliato anche per i pazienti con infezione da HIV o altre situazioni di immunocompromissione e per la tubercolosi extrapolmonare eccettuate le forme disseminate, meningee ed osteoarticolari in cui il trattamento va proseguito per almeno 12 mesi. La seconda fase del trattamento può essere, inoltre, prolungata a 28 settimane nel

caso di pazienti con caverne polmonari alla prima radiografia e colture dell'escreato positive dopo due mesi di trattamento. Tra i trattamenti adiuvanti della malattia tubercolare trova posto la terapia corticosteroidica, che per i suoi effetti antinfiammatori è indicata nel caso di quadri a componente essudativa molto pronunciata: pleurite, infezione primaria con notevole compromissione linfonodale e bronchiale, polmonite, e meningite. In questi casi i corticosteroidi sono prescritti per 4-12 settimane alla dose di circa 10-20 mg/die di prednisone. In realtà, evidenze che supportino l'uso dei corticosteroidi esistono solo per la meningite e la pericardite tubercolare (72).

I dosaggi ottimali dei farmaci antitubercolari di prima linea, secondo le linee guida del WHO aggiornate al 2010, sono indicati di seguito (Tab. 4).

Drug	Recommended dose			
	Daily		3 times per week	
	Dose and range (mg/kg body weight)	Maximum (mg)	Dose and range (mg/kg body weight)	Daily maximum (mg)
Isoniazid	5 (4-6)	300	10 (8-12)	900
Rifampicin	10 (8-12)	600	10 (8-12)	600
Pyrazinamide	25 (20-30)	-	35 (30-40)	-
Ethambutol	15 (15-20)	-	30 (25-35)	-
Streptomycin ^a	15 (12-18)		15 (12-18)	1000

Tabella 4 dosaggi dei farmaci antitubercolari di prima linea

Esistono differenti regimi di trattamento per i pazienti con nuova diagnosi di tubercolosi, quello ottimale prevede la somministrazione giornaliera di farmaci per l'intero periodo, uno schema antibiotico alternativo consiste nell'assunzione dei farmaci 3 volte a settimana. Quest'ultima modalità è risultata associata ad una più frequente acquisizione di resistenze, a un più alto tasso di riattivazioni e rischio di fallimento terapeutico (71,69).

Le popolazioni di micobatteri contengono tuttavia dei germi naturalmente resistenti agli antitubercolari. La selezione di questi mutanti per via dell'effetto di un trattamento non indicato (tassi ematici insufficienti, scelta incorretta di associazione farmacologica) può portare all'apparizione di una nuova popolazione resistente a diversi antibiotici. Il rischio di generare ceppi resistenti giustifica i 3 principi fondamentali del trattamento standardizzato della tubercolosi: la scelta iniziale di un'associazione quadrupla, il trattamento prolungata, la scelta di associazioni farmacologiche fisse. In corso di terapia anti-tubercolare è necessario un duplice e periodico monitoraggio dell'efficacia del trattamento e degli eventuali effetti collaterali. Generalmente la carica bacillare negli espettorati diminuisce rapidamente sotto l'effetto di un trattamento efficace entro i primi due mesi. L'esame degli espettorati dei pazienti portatori di tubercolosi polmonare positiva all'esame diretto permette di verificare

l'effetto del trattamento e individuare l'eventuale comparsa di una resistenza. Si consiglia di effettuare un esame degli espettorati (diretti o indotti) in caso di tubercolosi polmonare bacillare al termine della fase iniziale (secondo mese), durante la fase di proseguimento (alla fine del quinto mese). Se alla fine del secondo mese di terapia l'esame diretto è sempre positivo deve far sospettare una ridotta *compliance* da parte del paziente, problemi di malassorbimento o la presenza di farmacoresistenza (3) ed il trattamento è da ritenersi fallito con conseguente necessità di modificare il regime terapeutico in corso. L'esame radiologico non è necessario per seguire l'evoluzione della tubercolosi polmonare e permette di valutare indirettamente la risposta al trattamento. Si consiglia di procedere alla radiografia toracica al termine della fase iniziale (dopo due mesi di terapia) al termine del trattamento (alla fine del sesto mese). Nei casi con esame colturale dell'escreato negativo, la risposta alla terapia è monitorizzata sulla base della riduzione dei sintomi e sul confronto del quadro radiologico a tre mesi di terapia con quello al momento della diagnosi. È sempre raccomandata l'esecuzione di una radiografia del torace anche al termine del trattamento. In considerazione della tossicità di alcuni farmaci antitubercolari è importante monitorare, mediante un'attenta analisi della sintomatologia del paziente ed esami ematochimici e strumentali (Tab. 6), l'eventuale comparsa di effetti collaterali, principalmente a carico del fegato e del sistema nervoso centrale e periferico. Altri possibili effetti collaterali possono coinvolgere il sistema articolare e la cute (Tab. 5)

Epatotossicità

L'effetto secondario indotto dalla terapia antitubercolare più frequentemente riscontrabile è l'epatotossicità, in particolare da isoniazide, rifampicina e pirazinamide, che sono metabolizzati dal fegato. L'incidenza di epatotossicità durante una terapia standard è compresa tra il 2% e il 28% ed è maggiore in relazione ai fattori di rischio, come età avanzata, sesso femminile, malnutrizione, infezione da HIV, epatite virale pre-esistente, predisposizione genetica del profilo metabolico (acetilatori lenti della N-acetiltransferasi), alcolismo, dosaggio elevato.

Una significativa elevazione delle transaminasi è riportata nello 0,5% di tutti i pazienti trattati con solo isoniazide. L'isoniazide provoca steatosi epatocellulare e necrosi attraverso la liberazione di un suo metabolita, l'idrazina). La rifampicina potenzia l'epatotossicità dell'isoniazide, ma di per sé è scarsamente epatotossica (occasionalmente induce la colestasi). La rifampicina può causare da una transitoria iperbilirubinemia a lesioni epatiche caratterizzate da necrosi centrolobulare e colestasi. La pirazinamide è tra questi antibiotici il più epatotossico e determina un grave danno epatico quando somministrata a dosaggio elevato. Il danno si manifesta con necrosi estesa, infiltrazione linfocitaria, colestasi focale,

fibrosi e cirrosi micro nodulare. In rari casi la pirazinamide può provocare epatiti fulminanti di natura immunoallergica. (73,74)

Clinicamente l'epatite farmaco indotta è difficilmente distinguibile da una qualsiasi epatite virale, manifestandosi con ittero, dolore addominale, nausea, vomito e astenia.

Si raccomanda pertanto un monitoraggio della funzionalità epatica (AST, ALT, FA e GGT). La comparsa di un'epatite da farmaci (indici di necrosi epatica >5 volte il limite superiore della norma), in corso di terapia antitubercolare, è un criterio di sospensione del trattamento fino alla risoluzione del danno epatico. Successivamente è possibile riprendere il medesimo regime terapeutico, fatta eccezione per i casi di epatite severa in cui è indicata la somministrazione di un regime alternativo che non preveda l'impiego di pirazinamide e rifampicina (75,76).

Neurotossicità

La neuropatia periferica associata all'isoniazide può essere prevenuta somministrando quotidianamente vitamina B6 (piridossina), 40 mg/die. Il rischio aumenta in caso di gravidanza, alcolismo, malnutrizione, infezione con HIV ed epatopatie croniche. La tossicità ottica dell'etambutolo insorge con il trattamento prolungato o con dosi pari o superiori a 25 mg/kg. In questo caso è opportuno procedere a un elettroretinogramma o a potenziali visivi evocati all'inizio del trattamento e in seguito ogni mese per individuare l'esordio di nevrite ottica retrobulbare. I pazienti trattati per due soli mesi a dosi inferiori (15 – 20 mg/kg) devono essere sensibilizzati nei riguardi dei possibili effetti indesiderati del trattamento e sottoposti a controlli clinici. I pazienti che assumono aminoglicosidi (streptomina, amikacina) devono essere seguiti mediante audiogrammi mensili per fenomeni di ototossicità indotti da questa classe di farmaci.

Artrite

La somministrazione di pirazinamide è normalmente accompagnata da un aumento dell'acido urico, che in generale non ha sequele cliniche. Un controllo del tasso sierico è indicato esclusivamente dopo l'esordio di sintomi articolari, anche se non sussiste una correlazione fra tasso sierico e intensità della sintomatologia.

Reazione cutanea

In presenza di prurito senza lesioni cutanee visibili, viene proposto un trattamento sintomatico con antistaminici senza modificare la terapia. Qualora comparissero lesioni cutanee, interrompere immediatamente la somministrazione degli antitubercolari e reintrodurli separatamente una volta scomparse le lesioni. La relazione causale tra farmaco ed

esantema cutaneo iatrogeno è variabile con probabilità in ordine crescente per isoniazide, rifampicina, pirazinamide, etambutolo, streptomina. Utile procedere ad una reintroduzione progressiva per ciascun farmaco (77).

Farmaco	Frequente	Occasionale	Raro
Isoniazide (H)		epatite, reazione cutanea d'ipersensibilità, neuropatia periferica	vertigini, convulsione, nevrite ottica, disturbi mentali, anemia emolitica o aplastica o sideroblastica, agranulocitosi, reazione lupoide, artralgia, ginecomastia
Rifampicina (R)		epatite, reazione cutanea, disturbi digestivi, trombocitopenia, porpora, stato febbrile, sindrome influenzale	dispnea, choc, anemia emolitica, insufficienza renale*
Pyrazinamide (Z)	anoressia, nausea, flush	epatite, vomito, artralgia, iperuricemia, reazione cutanea	gotta, fotosensibilizzazione
Etambutolo (E)		nevrite retrobulbare, artralgia	epatite, reazione cutanea, neuropatia periferica

Tabella 5 Effetti collaterali dei farmaci antitubercolari di prima linea. World Health Organization, Treatment of tuberculosis. Guidelines for National Programmes

	Categoria di trattamento	Raccomandazioni
Esame degli espettorati (esame diretto e coltura)	tubercolosi polmonare bacillare	fine 2° e 5° mese di trattamento (esame diretto e coltura)
Rx torace	tubercolosi polmonare o intratoracica	fine 2° mese fine del trattamento
Epatotossicità: ALAT (alanina-aminotransferasi)		facoltativo 1u/2 sett. durante la fase iniziale, poi 1u/mese, sistematica se: sintomi digestivi, HIV, alcolismo, malnutrizione, diabete, malattia epatica cronica
Aggiunta di piridossina (vitamina B ₆)	gravidanza, HIV, alcolismo, malnutrizione, diabete, epatopatia cronica	10–40 mg/die durante tutta la durata del trattamento
Visione dei colori	compreso E	elettroretinogramma o potenziali evocati visivi 1u/mese a partire dal 2° mese di somministrazione dell'E se quest'ultimo deve essere somministrato per una durata superiore a 2 mesi o a dose >20 mg/kg
Audiogramma	se è compreso anche un aminoglicoside (S)	1u/mese

Tabella 6 Monitoraggio dell'efficacia e degli effetti collaterali in corso di terapia anti-tubercolare.

Per ragioni epidemiologiche, è importante conoscere il risultato del trattamento dei malati tubercolari di un paese o di una regione secondo i criteri standardizzati. L'OMS, l'Unione internazionale contro la tubercolosi e il Gruppo di consenso europeo raccomandano di valutare l'esito del trattamento di una tubercolosi (78), almeno per quel che riguarda le forme polmonari bacillifere, secondo otto categorie reciprocamente esclusive (Tab. 7).

Guarigione	Trattamento compiuto e documentato con conversione colturale
Trattamento compiuto	Trattamento completato senza documentazione di conversione colturale
Trattamento interrotto	Interruzione del trattamento per almeno due mesi o non completamento del trattamento per nove mesi per un programma di sei mesi (rispettivamente per 12 mesi per un programma di 9 mesi) o assunzione dei farmaci <80%
Insuccesso del trattamento	Persistenza o ricomparsa di colture positive per <i>M. tuberculosis</i> dopo cinque mesi di trattamento o più
Decesso per la TB	Decesso dovuto alla TB, prima o durante il trattamento antitubercolare
Decesso per altre ragioni	Decesso dovuto ad altre ragioni (non a TB), prima o durante il trattamento anti-tubercolare
Trasferimento	Paziente trasferito ad un altro servizio e per il quale si ignora l'esito del trattamento
Altri risultati	per es. continuazione del trattamento di un caso di MDR

Tabella 7 Esito del trattamento anti-tubercolare secondo l'OMS Europa

Esistono, infine, situazioni cliniche nelle quali sono richiesti regimi terapeutici particolari: le due più importanti sono le forme di tubercolosi sostenute da ceppi multifarmacoresistenti e la coinfezione tubercolosi/HIV.

Tubercolosi multi ed estesamente farmaco-resistente (MDR-TB/ XDR-TB)

Si tratta di un fenomeno che ha ricevuto la massima attenzione internazionale all'inizio degli anni '90, con lo sviluppo di epidemie di ceppi tubercolari multi resistenti (MDR-TB) verificatesi in soggetti HIV-positivi negli Stati Uniti e in Europa (79). Costituiscono, però, un'assoluta novità le proporzioni epidemiologiche del fenomeno e lo sviluppo di profili di resistenza sempre più estesi rilevati dagli attuali programmi di sorveglianza internazionali e nazionali. Per convenzione si definiscono MDR-TB quelle forme di tubercolosi sostenute da micobatteri che mostrano un alto livello di resistenza all'isoniazide ed alla rifampicina, con o senza resistenza ad altri farmaci antitubercolari. Con il termine *Extensively Drug Resistant Tuberculosis* (XDR-TB), invece, si intende una malattia provocata ceppi di *M. tuberculosis* resistenti a isoniazide, rifampicina, un fluorochinolone ed ad almeno una molecola iniettabile tra quelle di seconda linea (amikacina, capreomicina e kanamicina) (80). Il termine XDR è stato coniato per la prima volta nel 2006 a seguito di una epidemia di tubercolosi estesamente resistente in una zona rurale del Sud Africa, Tugela Ferry (81). Alla base delle resistenze agli antitubercolari sussiste la selezione di mutanti batterici con un'innata resistenza ai chemioterapici. La resistenza alla rifampicina è provocata da una mutazione puntiforme nel gene *rpo β* che codifica per la subunità β dell'RNA polimerasi. La resistenza all'isoniazide è dovuta a mutazioni a livello di due siti principali, il gene *katG* ed il gene *inhA*. Queste mutazioni non sono direttamente collegate e così mutazioni separate sono necessarie perché un microrganismo suscettibile diventi multi-farmacoresistente (82). Diversi

fattori favoriscono la selezione di mutanti batterici farmacoresistenti. Tra questi un ruolo di rilievo spetta a pregressi trattamenti antitubercolari inadeguati (aggiunta di un solo nuovo farmaco ad un regime antitubercolare fallimentare, mancata identificazione di una resistenza preesistente) o incompleti (scarsa aderenza del paziente alla terapia). Lo sviluppo di resistenza è influenzato anche da fattori genetici dell'ospite: è stata osservata un'associazione tra gli alplotipi HLA - DRB1*1 / HLA - DRB1*14 e la suscettibilità a MDR-TB. Epidemie di tubercolosi farmaco-resistente possono, quindi, nascere dalla conversione di ceppi wild-type suscettibili in ceppi farmaco-resistenti durante il trattamento, ma anche dalla trasmissione di forme di *M. tuberculosis* resistenti tra individui (83). La farmaco-resistenza acquisita nel corso della terapia è la via principale da cui originano i ceppi tubercolari farmaco-resistenti. D'altra parte, il fattore più importante che ha portato alla crescita esponenziale dei casi di tubercolosi MDR e XDR sembra essere la trasmissione della resistenza. Il ruolo svolto dalla resistenza trasmessa può essere chiarito dalla valutazione della clonalità dei ceppi micobatterici nel corso di epidemie di tubercolosi: ad esempio l'85% dei ceppi di tubercolosi XDR isolati nell'epidemia nella regione di Tugela Ferry in Sud Africa appartengono alla stessa famiglia genotipica, la famiglia KwaZulu- Natal (81). Dal punto di vista clinico, le manifestazioni di MDR-TB e XDR-TB non differiscono da quelle sostenute da ceppi sensibili, ma la prognosi è peggiore. Tutti gli studi finora condotti evidenziano un'aumentata probabilità di fallimento terapeutico ed un'accresciuta mortalità nei casi di XDR-TB (81). Il trattamento delle forme MDR/XDR prevede l'impiego di farmaci di seconda linea (Tab.8). Sono stati proposti diversi schemi la cui scelta suggeriscono le linee guida internazionali, deve essere fatta se possibile sulla base dei risultati dell'antibiogramma. Qualsiasi farmaco di prima linea a cui *M. tuberculosis* sia sensibile deve essere utilizzato, così come ogni appropriato antitubercolare di seconda linea, in modo da stabilire un regime con almeno 4-5 molecole efficaci. Se possibile, dovrebbe essere incluso nel regime almeno un farmaco iniettabile. Il trattamento deve prolungarsi per almeno 18 mesi.

Farmaci di prima linea	Iniettabili	Fluorochinolone	Batteriostatici	Altri
– (Isoniazide)	– Streptomycine,	– Ciprofloxacine,	– Ethionamide,	– Rifabutine
– (Rifampicine)	Amikacine	Ofloxacine,	Prothionamide	– Amoxicilline /
– Pyrazinamide	– Capreomycine	Levofloxacine,	– Cycloserine	ac. Clavulanique
– Ethambutol	– Kanamycine	Moxifloxacine,	– PAS	– Linezolid
		Gatifloxacine,		– Clarithromycine
		Sparfloxacine		– Thiacetazone
				– Isoniazide intermit- tente a dose alta

Tabella 8 Farmaci anti-tubercolari di seconda linea per il trattamento della tubercolosi multi-farmaco resistente (MDR-TB) ed estesamente multi-farmaco resistente (XDR-TB)

1.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

L'epidemiologia molecolare rappresenta un ponte di collegamento fra l'epidemiologia classica, propriamente detta, e la biologia molecolare, attraverso il terreno della scienza clinica, della statistica e della genomica. L'epidemiologia molecolare utilizza, pertanto, un approccio multidisciplinare allo scopo di studiare da vicino il fenomeno macroscopico della diffusione delle malattie infettive all'interno della popolazione umana, identificando i fattori che ne determinano la causa, la propagazione e la distribuzione nel tempo e nello spazio. Le sue ricadute applicative abbracciano sia il campo della clinica, sia quello della salute pubblica. Lo studio biologico di *M. tuberculosis* si concentra sui tentativi di tipizzazione del bacillo stesso. In microbiologia con i termini tipo, ceppo o clone si fa riferimento all'insieme di microrganismi appartenenti ad una specie, i quali condividono ulteriori caratteristiche che non sono presenti negli altri microrganismi di quella determinata specie. L'utilità di una particolare caratteristica microbica ai fini della tipizzazione è collegata alla sua stabilità genomica all'interno di un ceppo ed al suo polimorfismo genetico nell'ambito di una determinata specie. Tale polimorfismo, frutto della divergenza genetica provocata dall'accumulo di piccole mutazioni genetiche casuali, nel corso del tempo ha delineato diversi profili genetici che caratterizzano i vari ceppi nell'ambito della medesima specie microbica. Determinare il profilo genotipico dei micobatteri significa discriminare in modo univoco varianti microbiche appartenenti alla stessa specie in base ad una differenza nel numero e nella posizione di specifici marker molecolari, ovvero sequenze di DNA presenti all'interno del genoma di micobatterico. In altri termini la genotipizzazione permette di associare un profilo di identità unico per ogni singolo ceppo di *M. tuberculosis*.

Nel caso degli studi di epidemiologia molecolare sulla tubercolosi, si presuppone che isolamenti clinici correlati epidemiologicamente tra di loro derivino dall'espansione clonale di un singolo precursore. Questo è dimostrabile attraverso l'applicazione delle metodiche di tipizzazione che riconoscono le caratteristiche comuni al clone cellulare ed, al contempo, escludono la presenza di polimorfismi peculiari a ceppi geneticamente differenti.

La tipizzazione di isolati micobatterici da pazienti è utile a diversi scopi. Da un punto di vista clinico consente di classificare il secondo episodio di tubercolosi come frutto di una riattivazione o di una reinfezione, di associare ai vari ceppi specifici pattern di farmaco-sensibilità, di individuare l'origine e di descrivere l'evoluzione di un nuovo cluster epidemico. Nei programmi di controllo della malattia, la genotipizzazione permette di identificare gruppi ad alto rischio per tubercolosi, di migliorare le tecniche di analisi dei

contatti con paziente affetto e di verificare l'efficacia dei programmi di prevenzione e trattamento.

Allo stato d'arte attuale esistono tre diverse metodiche di genotipizzazione del DNA di *M. tuberculosis* complex: analisi mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), spoligotyping, MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat*), *deletion mapping* e analisi dei polimorfismi a livello di singoli nucleotidi. La scelta della metodica migliore deve assecondare l'obiettivo da raggiungere nella maniera più appropriata possibile.

Restriction Fragment Length Polymorphism DNA Fingerprinting

L'RFLP è una metodica basata sull'utilizzo della sequenza di inserzione IS6110 come *marker* molecolare. Rappresenta attualmente la tecnica più diffusamente applicata nei diversi laboratori per la genotipizzazione di *M. tuberculosis* (98). Le sequenze di inserzione sono elementi genetici mobili o trasponibili (TGE), ovvero sequenze di DNA capaci di trasferirsi da un sito del genoma ad uno o più siti differenti. Attualmente la sequenza maggiormente utilizzata è il frammento di inserzione IS6110, presente esclusivamente nel genoma di *M. tuberculosis* complex (99,100). La capacità di discriminare tra i diversi genotipi tubercolari attraverso l'utilizzo di IS6110 è legata alla differenza di numero e di posizione di tale sequenza all'interno del genoma micobatterico, conseguente alla duplicazione e/o al movimento del frammento per delezione o per riarrangiamento del DNA cromosomico (101,102). L'emivita di trasposizione di IS6110, ovvero il periodo durante il quale il profilo di ibridazione IS-specifico non muta, è di circa 3-4 anni. Ne consegue che i profili RFLP sembrano essere sufficientemente stabili e polimorfici per lo studio delle dinamiche di trasmissione della tubercolosi nel tempo e nello spazio (103,104). Dopo estrazione del DNA genomico degli isolati e digestione tramite enzima di restrizione PVUII, i frammenti di DNA ottenuti, una volta separati tramite elettroforesi, sono sottoposti a *Southern blot* ed a successiva ibridazione con sonda specifica IS6110 precedentemente marcata (Fig.12). I pattern di ibridazione sono visualizzati tramite chemiluminescenza ed autoradiografia (102). Questa metodica ha un elevato potere discriminativo e i risultati sono stabili e riproducibili, ma presenta alcune criticità. In primo luogo, richiede notevoli quantità di DNA ottenibile solo dopo prolungata coltura, cosa che comporta un notevole ritardo nei risultati; secondariamente è abbastanza costosa e necessita di sofisticati sistemi *software* per l'analisi e la comparazione dei risultati. Infine, ha un basso potere discriminativo per isolati con un numero di copie di IS6110 inferiore a 6, richiedendo quindi l'utilizzo di una metodica di tipizzazione secondaria per la differenziazione di tali isolati (Fig.12).

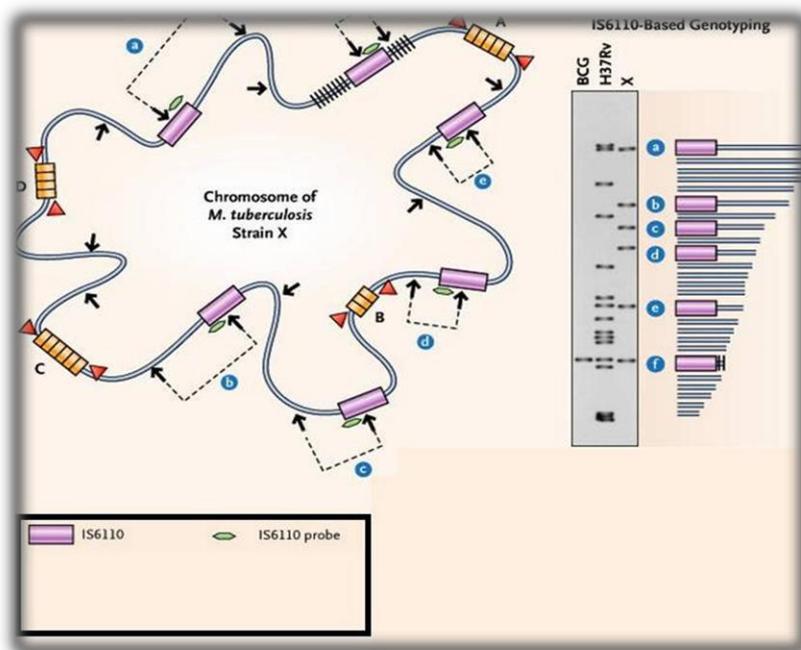


Figura 12 Sequenza di inserzione IS6110 nel genoma di *M. tuberculosis* e siti di clivaggio dell'enzima di restrizione PVUII nella metodica di genotipizzazione RFLP-DNA fingerprinting.

Spoligotyping

Lo *Spacer oligonucleotide typing* è una tecnica di genotipizzazione molecolare introdotta nel 1993 ma sviluppata nel 1997 e più comunemente usata per caratterizzare gli isolati appartenenti a *M. tuberculosis complex*.

La metodica di spoligotyping utilizzata per lo studio prevede una previa estrazione di DNA micobatterico da colture solide o liquide di campioni biologici di pazienti tubercolotici mediante lisi al calore.

Tale metodica basata sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di amplificare nel DNA micobatterico il *locus* cromosomico DR e a sua volta le molteplici sequenze ripetute contenute (DRs, *direct repeats*) di 36 paia di basi separate da *spacer* (43 sequenze spaziatrici) non ripetitive della lunghezza di 36-41 paia di basi (129). I ceppi di *M. tuberculosis* differiscono tra loro per il numero delle DRs e per la presenza/assenza delle sequenze spaziatrici. Il polimorfismo del *locus* DR, su cui si fonda lo *spoligotyping*, è dovuto alla ricombinazione omologa tra DRs vicine o distanti ed al riarrangiamento guidato dalla sequenza di inserzione IS6110, la quale è presente nella regione DR della maggior parte dei ceppi di *M. tuberculosis*.

Più nello specifico la variabilità della regione DR presa in considerazione è data dal fatto che possono verificarsi due possibili eventi di riarrangiamento genetico: la variazione di una o di

poche ripetizioni contigue con la relativa sequenza *spacer* vicina, definita anche come *Direct Variable Repeats* (dovuta probabilmente proprio alla ricombinazione omologa tra DRs cromosomiche adiacenti o distanti) e/o la delezione degli *spacer* guidata dalla trasposizione di un elemento IS6110 presente nel locus DR. (105)

Le ripetizioni DR non possono aggiungersi tra le sequenze, ma vengono perse irreversibilmente. (105) Gli eventi di delezione possono verificarsi più volte nel tempo e indipendentemente in ceppi non correlati; pertanto l'identico spoligotipo tra due ceppi può essere il risultato di un evento di evoluzione convergente. (131)

La presenza o l'assenza del segnale relativo ad ogni *spacer* nell'immagine fotografica viene registrata secondo un codice binario ottenendo una stringa numerica di 43 cifre iniziali; il segnale positivo è associato alla visualizzazione del quadrato nero in corrispondenza dello *spacer* e ad esso si attribuisce un valore pari a 1. Al contrario l'assenza di segnale è considerato come mancanza di *spacer* e ad esso è associato il valore 0. La stringa numerica di 43 cifre verrà poi suddivisa a triplete, ad eccezione dell'ultima, così da ridurre a 15 cifre l'intero campione secondo un *octal code*. A seguito dell'avvenuta decodifica i risultati ottenuti sono messi a confronto con i campioni inseriti nel database internazionale SpolDB4 che contiene dati di spoligotipi già conosciuti (ST), i quali a loro volta sono catalogati nel database in *lineage* e *sub-lineage*. (125)

Questa metodica risulta essere vantaggiosa in quanto i risultati sono altamente riproducibili ed i dati derivati, espressi in forma binaria, possono essere facilmente interpretati e possono consentire il confronto tra diversi laboratori. Inoltre lo *Spoligotyping* richiede piccole quantità di DNA (circa due microgrammi di DNA micobatterico) e di conseguenza poco tempo per la crescita, seppur lenta, del campione, diversamente dalla IS6110 RFLP che necessita una maggiore quantità di materiale di partenza della coltura. Garantisce, poi, la simultanea identificazione e tipizzazione di più ceppi contemporaneamente appartenenti al *M. tuberculosis complex* con la distinzione di *Mycobacterium bovis* da *M. tuberculosis* (133).

Anche se lo *spoligotyping* può essere un metodo efficace per lo studio dell'epidemiologia molecolare di *M. tuberculosis*, il suo potere discriminativo è inferiore a quello garantito dalla IS6110 RFLP. Possono infatti essere individuati ceppi aventi uno stesso profilo allo *spoligotyping* ma diversi *patterns* IS6110. Ad esempio, i ceppi appartenenti alla famiglia W-Beijing, un grande gruppo di isolati di *M. tuberculosis* che comprende centinaia di varianti IS6110, hanno tutti lo stesso profilo allo *spoligotyping*. In questo caso lo *spoligotyping* può essere utile al fine di identificare i ceppi W-Beijing in una popolazione ma non consente la comprensione degli eventi di trasmissione soprattutto nelle regioni in cui questi genotipi sono

endemici. Al contrario, lo *spoligotyping* è utile per discriminare i ceppi caratterizzati da poche copie di IS6110.

In conclusione, il limitato potere discriminativo dello *Spoligotyping* è dovuto al fatto che questa metodica considera un singolo *locus* cromosomico, il quale rappresenta meno dello 0,1% del genoma di *M. tuberculosis*, diversamente dall'analisi secondo RFLP, la quale valuta la distribuzione di IS6110 lungo tutto il genoma.

MIRU-VNTR

Il MIRU-VNTR *typing* è una tecnica più recente e innovativa basata sull'amplificazione mediante multiplex PCR di elementi di DNA di 40-100 bp ripetuti in tandem in numero variabile definite come *Variable Numbers Tandem Repeats (VNTR)* e distribuite in regioni intergeniche nel genoma di *M. tuberculosis* complex definite appunto *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units MIRUs*. E' usata per genotipizzare i membri del MTBC e per individuare relazioni filogenetiche negli studi di epidemiologia molecolare (105).

Nel 2000 è stato evidenziato il polimorfismo nel numero e nelle dimensioni delle ripetizioni a livello di 12 loci MIRU sui 41 noti del ceppo di riferimento appartenenti al MTBC quali *M. tuberculosis H37Rv*, *M. tuberculosis CDC1551* e *M. bovis*., su cui è stata standardizzata la metodica (105,106).

Nei 41 loci MIRU-VNTR sono inclusi cinque loci ETR (Exact Tandem Repeat A-F) che insieme ai cinque loci MPTR (Mayor Polymorphic Tandem Repeat A-E) costituiscono i primi undici loci polimorfici utilizzati per identificare i ceppi del MTBC (106).

Il tasso di mutazione delle sequenze *microsatellite-like* è stato valutato tipizzando e confrontando i pattern ottenuti da campioni di *M. bovis* BCG con quelli ottenuti da sottocolture. L'analisi ha messo in evidenza come i pattern anche dopo centinaia di repliche, variavano solo per un locus rispetto a quelli della coltura originaria; ciò mostra come il tasso di mutazione delle sequenze sia sufficientemente lento da permettere l'utilizzo dei loci come marcatori genetici validi per la genotipizzazione (107).

Il meccanismo di acquisizione e perdita di *repeats* in questi loci non è ancora stato completamente chiarito, ma si ipotizza che eventi *slipped-strand mispairing (SSM)* della DNA polimerasi possano esserne la causa. Uno studio generale sul trend evolutivo del numero di copie in MIRU-VNTR ha dimostrato come esso sia in decrescita. La tecnica prevede l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione dei diversi loci.

La dimensione dei prodotti di amplificazione riflette la posizione e il numero di VNTR amplificati.

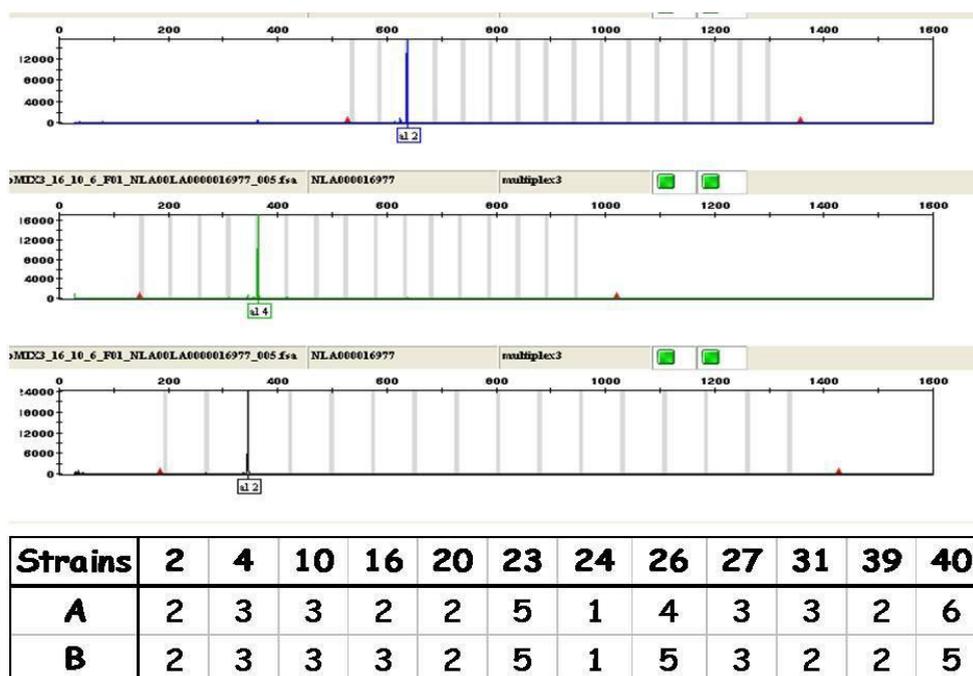


Figura 13a, 13b Assegnazione allelica automatizzata (Genemapper software) delle ripetizioni alleliche in tre loci MIRU e rappresentazione del pattern genotipico finale.

Confronto tra metodiche

Il potere discriminativo del MIRU-VNTR è quindi ancora ad oggi argomento di acceso dibattito in letteratura. Nei primi anni dall'introduzione di questo sistema di DNA *fingerprinting* la capacità discriminante della MIRU sembrava essere pari a quella della IS6110 RFLP fino ad allora ritenuto il *gold standard* (107, 108,109,110).

Studi comparativi con lo *Spoligotyping* del 2003 hanno evidenziato che i *cluster* definiti attraverso lo *Spoligotyping* erano ripartiti in sotto-*cluster* MIRU; al contrario tutti gli isolamenti clinici raggruppati in cluster mediante MIRU appartenevano a specifici cluster definiti mediante *Spoligotyping*. Il potere discriminativo espresso attraverso l'indice di Hunter-Gaston fu pari a 0,965 per lo *Spoligotyping* e 0,988 per la MIRU-VNTR (111). Nel

2005 lo studio di Scott ha prodotto risultati divergenti dalle opinioni fino a quel momento diffuse circa la sensibilità e la specificità di *Spoligotyping* e MIRU, evidenziando una bassa sensibilità ed una bassa specificità per entrambe le metodiche rispetto all'RFLP. Un lavoro del 2006 ha concluso che il potere discriminativo dell'analisi MIRU-VNTR è proporzionale al numero di loci valutati. In generale, quando solo 12 loci vengono valutati, la metodica è meno discriminante della genotipizzazione basata su IS6110 RFLP per isolati con molte copie di IS6110 ma più discriminante per isolati con un basso numero di sequenze IS6110. Se vengono utilizzati più di 12 loci o l'analisi mediante MIRU è associata allo *Spoligotyping*,

allora il potere discriminativo diventa approssimativamente pari a quello dell'analisi IS6110 RFLP (105). Nel 2007 uno studio epidemiologico-molecolare condotto nella città di Amburgo, in un contesto a bassa incidenza di tubercolosi, tramite IS6110 RFLP, MIRU ottimizzata (cioè a 15 o 24 loci) e tramite l'associazione MIRU - *Spoligotyping*. Ha evidenziato come il MIRU ottimizzato, soprattutto se combinato con lo *Spoligotyping*, ha un valore predittivo superiore a quello dell' IS6110 RFLP (112). In sostanza, da questi studi del 2008 si può concludere che i risultati forniti dal MIRU-VNTR debbano tenere conto della distanza genetica. Infatti, in situazioni in cui è bassa l'incidenza della tubercolosi la distanza genetica tra isolati non correlati da un punto di vista epidemiologico è sufficiente per definire un ceppo sia mediante RFLP che mediante MIRU. Diversamente, in una condizione di alta incidenza, la continua evoluzione dei ceppi denota la debolezza propria di questi marcatori (113).

Il più recente studio che ha messo a confronto le tre diverse metodiche in una regione a bassa incidenza per tubercolosi è stato pubblicato in Germania nel 2011. I dati raccolti hanno rivelato un potere di risoluzione complessivamente più elevato nel IS6110 RFLP rispetto al MIRU VNTR 24-loci, benché vi fosse un elevato livello di concordanza (93%). La discordanza tra le due metodiche, in termini di potere discriminativo, è apparsa più ampia per particolari *lineage* filogenetici, in particolare per i ceppi appartenenti alla famiglia Beijing. Infatti nonostante siano stati delineati due cluster Beijing da entrambe le metodiche, il MIRU VNTR raggruppava nel primo cluster più isolati insieme. (114).

Applicazione dell'epidemiologia molecolare

La caratterizzazione genetica dei diversi ceppi di *M. tuberculosis* rende possibile l'esecuzione di indagini epidemiologiche che si sono rivelate molto più sensibili rispetto alle classiche metodiche epidemiologiche, basate sul *contact tracing*, nell'individuare i percorsi epidemici della malattia. L'individuazione dei contatti è una strategia di per se imperfetta a causa delle complesse modalità di trasmissione: infatti, i contatti casuali rappresentano una proporzione significativa dei casi che l'analisi molecolare raduna in *cluster* ma che gli studi epidemiologici convenzionali giudicano come non correlati (105). Un *cluster* è un gruppo di ceppi che presentano un DNA *fingerprinting* identico (Fig.14). Dal punto di vista epidemiologico è considerato segno di una trasmissione recente tra i pazienti appartenenti al *cluster* mentre i ceppi singoli non appartenenti a *cluster* sono considerati casi sporadici, probabile espressione di riattivazioni di vecchie infezioni. Oltre a quantificare l'entità della diffusione epidemica della malattia, le metodiche di epidemiologia molecolare sono in grado di identificare i fattori di rischio che la favoriscono, suggerendo eventuali interventi per

interrompere la catena di trasmissione. Dalla loro standardizzazione queste metodiche sono state applicate in moltissimi paesi ed in ogni paese sono riuscite ad individuare quelle categorie a rischio (soggetti HIV positivi, immigrati di varie etnie, soggetti senza fissa dimora, alcolisti ecc.), diverse per ogni paese, sulle quali i programmi di controllo devono concentrarsi.

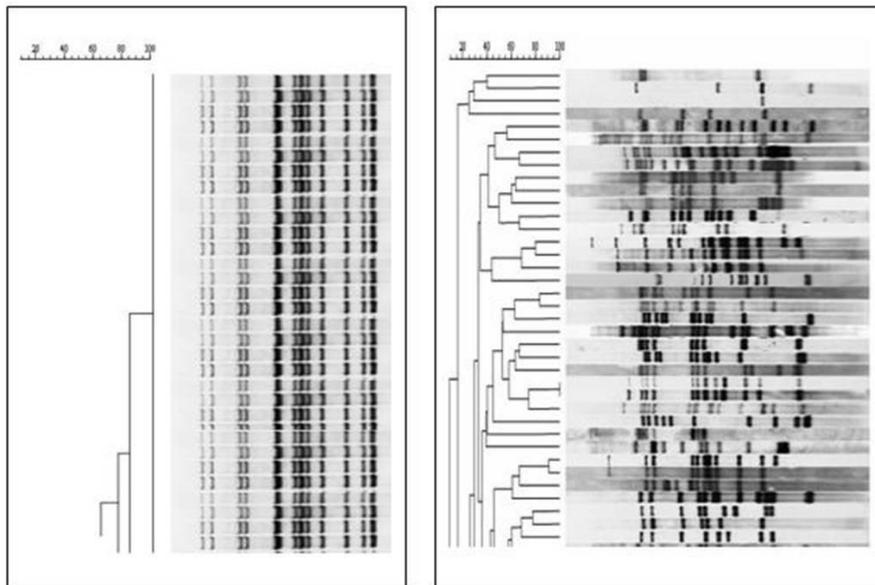


Figura 14 Analisi comparativa dei pattern genotipici IS6110 RFLP-DNA Fingerprinting di *M. tuberculosis* e costruzione dei dendrogrammi di similarità. A sinistra rappresentazione di un cluster (similarità del pattern genotipico del 100%), a destra raggruppamento di ceppi sporadici.

La tipizzazione di *M. tuberculosis* è utilizzata anche per identificare i casi di reinfezione *versus* riattivazione. Diversi studi hanno evidenziato che la reinfezione è possibile anche nelle regioni a bassa incidenza di tubercolosi, sebbene meno comune rispetto ai paesi ad alta incidenza; quest'ultima costituisce infatti il principale fattore di rischio per le reinfezioni. E' stato inoltre possibile effettuare mediante le metodiche di genotipizzazione studi di controllo per l'identificazione e la gestione delle cross-contaminazioni di laboratorio. Circa il 3% dei pazienti con isolamenti positivi per *M. tuberculosis* non ha la tubercolosi. In questi casi la positività delle colture è spesso dovuta a *cross*-contaminazioni di laboratorio. La contaminazione è più probabile quando l'esame microscopico dell'espettorato non evidenzia bacilli alcool acido resistenti e solo un campione delle colture è positivo. Quando *M. tuberculosis* viene isolato da un solo campione e i reperti clinici non sono suggestivi della malattia, allora la genotipizzazione del ceppo isolato nel paziente e degli altri ceppi presenti in laboratorio può suggerire l'evenienza di una *cross*-contaminazione e portare all'interruzione della terapia antitubercolare. Gli strumenti molecolari offrono anche la

possibilità di analizzare la relazione che intercorre tra forme cliniche di tubercolosi e profili genotipici di *M. tuberculosis* infettanti, ovvero analizzare il rapporto tra virulenza, genotipo e manifestazioni cliniche. Gli studi di genotipizzazione basati sulla popolazione hanno dimostrato che una piccola percentuale di ceppi produce un numero sproporzionatamente elevato di casi. Questo suggerisce che i diversi ceppi di *M. tuberculosis* hanno diverse interazioni con l'ospite ed hanno un diverso potenziale di trasmissione (115,116,117). La tipizzazione dei ceppi di *M. tuberculosis* ha infine permesso di individuare dei percorsi di derivazione filogenetica di alcuni ceppi e, grazie alla standardizzazione delle metodiche, ha permesso di tracciare la diffusione a livello mondiale di alcune di esse. La notevole eterogeneità genotipica evidenziata dalle metodiche di *fingerprinting* si riassume nell'esistenza di macro-famiglie di *M. tuberculosis* con una connotazione geografica, epidemiologica clinica e di risposta farmacologica differente. Il profilo di distribuzione di tali *lineage* si è modificato nel tempo guidato in parte da fattori di carattere biologico in parte da fattori dipendenti dall'ospite umano. Tra le famiglie più importanti ricordiamo Beijing, CAS (*Central Asia*), EAI (*East-African Indian*), LAM (*Latin-American and Mediterranean*) ed Haarlem (117).

2. Studio

2.1 INTRODUZIONE

La tubercolosi si conferma nel 2012 un rilevante problema di salute pubblica globale. Secondo i più recenti dati pubblicati dalla *World Health Organization (WHO)*, nel 2011 i casi di infezione da *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)* a livello mondiale sono stati circa 9 milioni; la TB infatti è considerata la prima causa di morte provocata da una patologia infettiva curabile. Benché per la prima volta si confermi una progressiva riduzione del numero assoluto dei casi di circa 1,3% per anno dal 2002, l'importanza epidemiologica della TB è attestata globalmente, tanto che la lotta a questa patologia rientra nell'ambito dei *Millenium Development Goal*, stabiliti dalla stessa *WHO* (19,21).

Vari fattori contribuiscono sinergicamente al mantenimento di questa infezione nella popolazione umana, tra i quali l'infezione da HIV, l'aumento dei tassi di farmaco – resistenza e l'inadeguatezza dei programmi di controllo della sua diffusione.

Nell'interpretazione della TB non si possono trascurare fattori sociali, politici ed economici, che, creando differenze nell'accesso ai servizi sanitari, aumentano la suscettibilità e l'esposizione alla malattia nelle fasce sociali più deboli. Si possono individuare gruppi definiti di maggiore vulnerabilità all'infezione: carcerati, tossicodipendenti, alcolisti, bambini, anziani, migranti e rifugiati (22,23).

Benché la tubercolosi polmonare rappresenti la più comune localizzazione di malattia con maggiori implicazioni anche da un punto di vista della sanità pubblica in termini di trasmissibilità e contagiosità, *M. tuberculosis* può determinare malattia in sedi extrapolmonari o determinare forme cosiddette disseminate con interessamento multi-organo. In ordine di frequenza le forme più comuni sono linfonodale, genito-urinaria, ossea e del sistema nervoso centrale. Secondo i più recenti dati del *WHO Global Tuberculosis report 2012* sul totale dei nuovi casi notificati pari a circa 6,2 milioni, quelli extrapolmonari sono risultati poco superiori a 800 mila (13%). Stratificando tale dato per macroarea geografica secondo i criteri della WHO, la proporzione più elevata di casi extrapolmonari si osserva nella Eastern Mediterranean Region (22%) e nell'Africa Region (16%). Percentuali equivalenti del 14% sono registrate nella South East Asia e America Region, a seguire con l'11% l'European Region, mentre la percentuale più bassa è quella della Western Pacific Region (5%). I dati epidemiologici relativi all'Italia mostrano una crescente quota di tubercolosi extrapolmonari nel 2011 pari al 32% del totale ovvero il doppio rispetto al medesimo dato ufficiale del 2009 (16%) a fronte anche di un numero di casi totali notificati nel 2011 in riduzione. Un evento che ha determinato in modo inequivocabile un significativo cambiamento nel quadro epidemiologico della tubercolosi e nella rappresentatività delle forme extrapolmonari e disseminate è stata la crescente pandemia da infezione da HIV. Se in era pre pandemica nei paesi industrializzati i casi di tubercolosi extrapolmonare in pazienti immunocompetenti rappresentavano circa il 15-20% del totale,

successivamente si è assistito a una rapida ascesa di tale percentuale nella popolazione HIV positive che ha raggiunto anche picchi del 50%. Oltre a distinguersi sul piano delle manifestazioni cliniche, la tubercolosi extrapolmonare e quella disseminate divergono dalla più classica forma polmonare anche in termini di diagnosi, prognosi ed outcome terapeutico.

Lo stato di immunodeficienza sostenuto da HIV o derivante da terapie immunosoppressive o attribuibile a patologie croniche non infettive è stato riconosciuto come condizione favorente allo sviluppo di forme disseminate di tubercolosi. Studi recenti hanno inoltre evidenziato come il rischio nonché la sede di localizzazione extrapolmonare risulti dipendente fattori dell'ospite quali l'origine geografica e il patrimonio genetico. A fronte di risultati in parte contrastanti, l'età, il sesso femminile, l'infezione da HIV e l'origine geografica costituirebbero fattori predisponenti per sedi di malattia extrapolmonari e disseminate. Oltre alle caratteristiche dell'ospite nella localizzazione di malattia sono implicate anche le caratteristiche intrinseche del micobatterio infettante. Circa il contributo di tale variabile una risposta in tal senso potrebbe derivare dall'applicazione delle metodiche di biologia molecolare finalizzate alla tipizzazione molecolare di *M. tuberculosis*. Un numero elevato di metodiche genotipiche basate sul polimorfismo del DNA micobatterico sono state sviluppate per differenziare, su scala globale, ceppi specifici, macrofamiglie e lineage evolutivi che costituiscono il *M. tuberculosis complex*. Le metodiche di *fingerprinting* hanno, in sostanza, permesso di individuare e classificare macrofamiglie genotipiche di *M. tuberculosis*, le quali sembrano avere una ripartizione geografica mondiale definite e una correlazione con caratteristiche di risposta farmacologica differenti. Inoltre nell'ambito della Salute Pubblica, lo strumento della genotipizzazione filogeografica di *M. tuberculosis complex* può essere utile per identificare le caratteristiche cliniche dei genotipi predominanti o emergenti (123,124) e le loro associazioni epidemiologiche con gli *outbreaks*, i tassi di trasmissione e la resistenza antibiotica.

Macrofamiglie genotipiche di *Mycobacterium tuberculosis complex* e loro distribuzione geografica secondo il Fourth International Spoligotyping Database (SpolDB4)

La distribuzione geografica dei principali *lineages* di *M. tuberculosis* è ben conosciuta globalmente e rispecchia la coevoluzione fra esseri umani e *M. tuberculosis complex* nel corso dei secoli. La geografia, la demografia e la storia migratoria dell'uomo hanno giocato un ruolo fondamentale nel modellare la struttura della popolazione genotipica micobatterica fino ad ottenere l'odierno panorama. Tali considerazioni si possono dedurre dal più importante e rappresentativo studio multicentrico di caratterizzazione genotipica mediante *Spoligotyping*, nato nel 2005 e coordinato dall'*Istituto Pasteur* della Guadalupa, che ha dato vita al database *SpolDB4* (125).

Tale studio ha, infatti, fornito una più realistica e attuale immagine istantanea della popolazione

genotipica globale e locale del bacillo tubercolare, attraverso l'analisi di 39.295 isolati clinici provenienti da 122 nazioni. Per maggior praticità, sono state considerate nella classificazione le seguenti macro-aree geografiche con lo scopo di accorpare le nazioni e definire zone a maggiore significatività statistica: Africa (AFR-1), Centro America (CAM-2), Europa (EUR-3), Estremo Oriente (FEA-4), Medio Oriente e Asia Centrale (MECA-5), Nord America (NAM-6), Oceania (OCE-7), Sud America (SAM-8) (Fig.15).

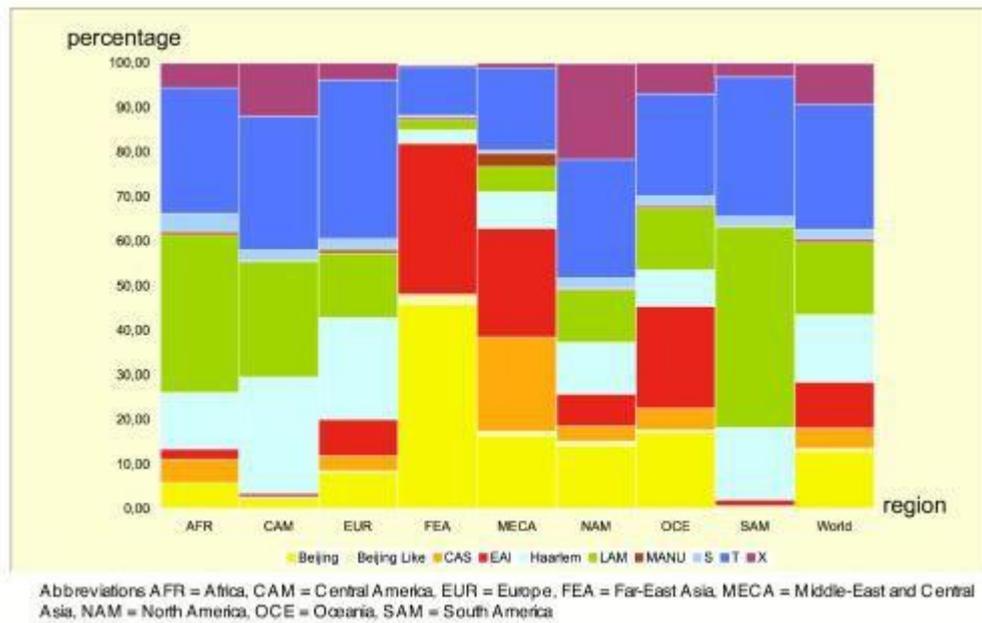


Figura 15. Percentuale delle principali famiglie genotipiche di MTC definite mediante Spoligotyping nel Database SPOLDB4 all'interno delle macro-aree prese in esame e nel mondo.

Sul totale dei ceppi, 35925 *Spoligo-patterns* appartengono a 1939 STs (*Shared Type*), i restanti 3370 (8,6%) sono risultati orfani. All'interno dei STs, 237 appartengono alla sottospecie *M. bovis*, mentre gli altri 1702 STs non sono *M. bovis*.

Il 61,8% (n = 22219) dei ceppi isolati tende ad aggregarsi in cluster nei 50 STs più frequenti, dimostrando che solo una esigua percentuale di ceppi appartenenti a specifiche famiglie è responsabile di un numero sproporzionalmente elevato di casi. Questo suggerisce che i diversi ceppi di *M. tuberculosis* hanno diverse interazioni con l'ospite, un diverso potenziale di trasmissione (2,3,4) e infettano popolazioni umane differenti seguendo una distribuzione geografica tipica.

Sono stati identificati 62 *lineages / sublineages* principali, attraverso l'uso di software dedicati che hanno ricercato similarità tra i pattern, effettuando numerosi accorpamenti (125). I *lineages* Beijing e Beijing – like rappresentano circa il 50% dei ceppi isolati in Estremo Oriente, mentre il 13% di quelli totali. Il genotipo Beijing che potrebbe essere stato endemico in Cina per un lungo periodo tempo, sta emergendo anche in altre parti del mondo, specialmente in alcuni stati dell'ex-URSS. Altri lavori hanno messo in luce la presenza di un'associazione tra la famiglia Beijing/W e specifici gruppi di età: in Vietnam la percentuale dei casi di tubercolosi sostenuta da Beijing/W è pari al 71% nei pazienti inferiori ai 25 anni, ma al 41% nei pazienti oltre i 55 anni (103). Si è attribuito al genotipo Beijing/W anche una tendenza nel determinare forme extrapolmonari (106) e rara comparsa di febbre, sudorazioni notturne e cavitazioni polmonari. Da quanto finora esposto sembra che il genotipo Beijing/W si trasmetta più facilmente e sia più virulento di altri ceppi di *M. tuberculosis*. Questo comportamento potrebbe dipendere da fattori estrinseci (ad esempio i movimenti delle popolazioni), ma anche da fattori intrinseci alla famiglia.

In Europa circa il 25% degli isolati appartiene alla famiglia genotipica Haarlem, mentre in Sud America circa il 50% dei ceppi appartiene al *lineage* LAM.

All'interno di quest'ultima famiglia, LAM7 è predominante in Asia minore (Turchia), LAM10 in Cameroun, mentre LAM11-ZWE e LAM12-Madrid1 sono di nuovo riscontro.

Tre principali famiglie genotipiche (Harleem, LAM e T) sono più frequenti in Africa, America Centrale, Europa e Sud America.

La “moderna” e assai frequente famiglia genetica T è stata riscontrata in tutti i continenti e raffigura il 30% del totale.

Essa rimane mal definita con più di 600 STs non classificabili, che sono stati stratificati in 5 sottofamiglie (T1 – T5) sulla base di singoli *spacers* differenti.

Il nome dei singoli sottogruppi viene costruito affiancando la designazione del clade superiore di appartenenza (T1 – T5) alla specifica presunta origine geografica (Es. ST254:

T5-Russia/1). ST1737, con un singolo spacer differente da ST254, è stato recentemente trovato in Italia e denominato come “Tuscany”.

Il *clade* Harleem accoglie 4 genotipi differenti e ubiquitari, ben rappresentati in Europa (125). Il genotipo EAI (East African Indian), che ha una prevalenza in tutta l’Asia tra il 24,3 e il 33,8%, è rappresentato soprattutto nel Sud – Est Asiatico.

All’interno di questo gruppo sono descritti 9 *sub-lineages*, tra questi si ricorda: EAI2, precedentemente denominato da Douglas et al. nel 2003 “Manila family”, EAI3-IND e EAI4-VNM, rispettivamente più rappresentati in India e Vietnam.

Il *clade* CAS, nello SPOLDB3 considerato unico, è stato suddiviso in CAS1-Dehli (ST26) e CAS1-Kilimanjaro (ST21).

La famiglia CAS1-Dehli è essenzialmente localizzata in Medio Oriente, nel centro e nel sud dell’Asia, preferenzialmente in India (75%), Iran e Pakistan. In Europa e Australia questi ceppi sono stati riscontrati unicamente in associazione a immigrati provenienti dal sud dell’Asia (Fig.16).

Il *lineage* X, di verosimile origine ancestrale Anglosassone, è rappresentato con discreta significatività nelle regioni del Nord e del Sud America.

Il *lineage* S, altamente prevalente in Sicilia e Sardegna, potrebbe essere identico al *clade* sudafricano F28.

Il genotipo Manu è, infine, una famiglia di nuovo riscontro proveniente dall’India.

Secondo quanto emerso da tale lavoro, il pattern di diversità filogeografica attuale è, senza dubbio, il risultato di una profonda differenziazione ecologica, ma anche della più recente storia demografica ed epidemiologica.

Si può, infatti, dimostrare che *M. tuberculosis* possiede una struttura geografica estremamente fine, specifica e complessa, che non può ricondursi esclusivamente a una mera e ampia descrizione per continenti.

Ne risulta che la pandemia globale di tubercolosi è, in realtà, la somma di assai diversi e geneticamente separati *outbreaks* individuali.

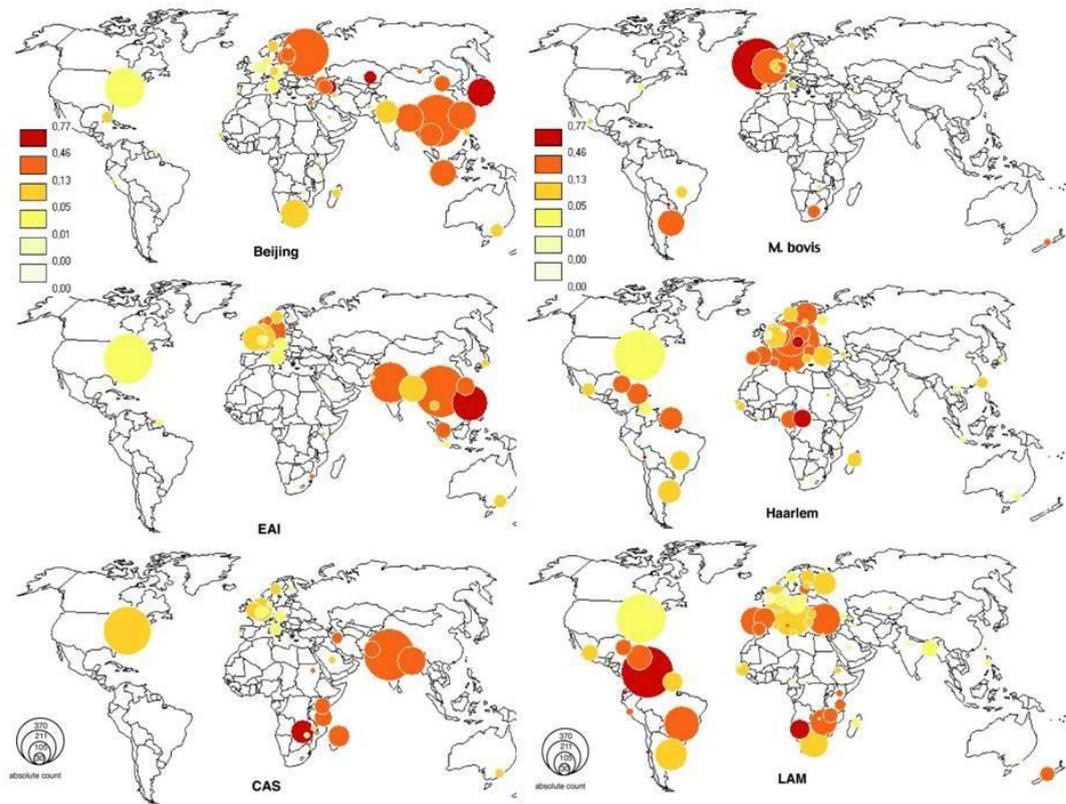


Figura 16. Planisfero nel quale sono mostrati il numero assoluto (diametro) e la percentuale (colore) di 3 famiglie genotipiche, Beijing, EAI e CAS, in ogni Stato, secondo il database SPOLDB4.

2.2 SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio è quello di analizzare le caratteristiche della tubercolosi comparando tra loro localizzazioni differenti al fine di identificare caratteristiche demografiche, cliniche o microbiologiche contraddistintive in relazione alla peculiare localizzazione di malattia.

Mediante la caratterizzazione genotipica degli isolati clinici ci si è posti lo scopo di verificare se determinati lineage micobatterici correlino con caratteristiche cliniche specifiche della patologia tubercolare nell'ipotesi di una espressione clinica differente in relazione al genotipo infettante.

2.3 PAZIENTI e METODI

La popolazione di riferimento dello studio è costituita da circa 4590 casi di tubercolosi diagnosticati nell'area metropolitana della città di Milano dal 1996 al 2010, rispetto ai quali sono stati selezionati quelli con diagnosi microbiologicamente accertata mediante esame colturale positivo. Di questi casi sono stati considerati quelli per i quali era disponibile l'isolamento colturale da sottoporre a genotipizzazione mediante *Spoligotyping* che ammontava ad un totale di 1579 episodi riferiti ad altrettanti pazienti. L'arco temporale dello studio si estende per quindici anni, a partire dal 1996 sino al 2010, suddiviso in 5 trimestri.

Fase clinica

Per ogni paziente incluso sono stati raccolti dati di carattere demografico (sesso, data di nascita, luogo di nascita espresso come nazione di origine, età al momento della diagnosi di tubercolosi), epidemiologico (fattori di rischio per tubercolosi: diabete, insufficienza renale cronica, neoplasie, malattie autoimmuni, immunodeficienza, terapie immunosoppressive, abuso alcolico, tossicodipendenza, carcerazione, contatto con caso di TB), clinico (localizzazione distinta in polmonare, extra-polmonare e disseminata, forma come nuovo caso/recidiva, quadro radiologico, esito della intradermoreazione di Mantoux, stato sierologico per infezione da HIV), microbiologico (esito esame microscopico diretto, profilo di sensibilità ai farmaci di prima linea con distinzione in ceppi sensibili, MDR e resistenti), terapeutico (schema di terapia anti-tubercolare, durata, effetti collaterali, esito).

I casi di tubercolosi sono stati distinti in quattro forme in base ai criteri di definizione redatti dalla WHO. In particolare:

- Polmonare: caso con diagnosi microbiologica e/o istologica accertata con o senza evidenza radiologica compatibile con quadro di tubercolosi attiva a localizzazione intratoracica (pomini, pleura, linfonodi intra-toracici)
- Linfonodale: caso con diagnosi microbiologica accertata o istologica di localizzazione esclusiva a livello linfonodale (esclusi quelli intratoracici)

-
- Extrapolmonare: caso con diagnosi microbiologica accertata su campione proveniente da qualsiasi sito extrapolmonare (escluso sangue e midollo osseo) ad eccezione della sede linfonodale
- Disseminata: caso con isolamento microbiologico da sangue, sangue midollare o con localizzazione di malattia microbiologicamente accertata coinvolgente almeno due organi non adiacenti.

Le fonti informative attraverso le quali sono stati desunti i dati comprendono le cartelle cliniche di degenza depositate presso l'archivio dell'A.O. – Polo Universitario “L. Sacco”, il database curato dall'Istituto “Villa Marelli” Centro di Riferimento regionale per il controllo della tubercolosi. I dati sono stati organizzati in un database elettronico utilizzando il programma di lavoro Microsoft Excel.

Fase molecolare

Estrazione DNA micobatterico

I micobatteri isolati dai pazienti con tubercolosi attiva sono stati seminati principalmente su terreno solido Lowenstein-Jensen all'interno di tipiche *vials* inclinate in modo che la superficie esposta all'aria risulti *a becco di clarino* (Fig. 17). I ceppi vengono mantenuti in coltura per circa 3-4 settimane a 37°C in incubatore a 0,5 % di CO₂.



Figura 17. Colonie di *M. tuberculosis* in vials di terreno solido Lowenstein-Jensen. I micobatteri tendono ad aggregarsi in colonie bianche e sferiche.

Mediante un'ansa sterile si è proceduto alla raccolta delle colonie stemperandole in *criovials* contenenti un volume finale di 1000 µl di terreno liquido Middlebrook 7H9 composto da Middlebrook in polvere (2,35 g), acqua (400 ml), glicerolo (50 ml), tween 80 (0,25 ml). Al terreno sterilizzato in autoclave per 10 minuti (temperatura di 120°C e una pressione di 2 bar), è stato aggiunto, in condizioni di asettiche (sotto cappa a flusso laminare), un arricchente (50 ml), in modo da ottenere un volume finale di 500 ml di terreno per campione.

Tali aliquote vengono crioconservate a -80°C .

Un' aliquota di coltura di ogni campione è stata stoccata in una provetta da 1,5 ml contenente 200 μl di acqua ultrapura. Queste ultime sono state inattivate al calore (95°C) per 45 minuti in un termostato a secco, quindi centrifugate a 13.000 rpm per 10 minuti a RT (temperatura ambiente), in modo che la parete micobatterica venga denaturata e precipiti sul fondo della provetta (*pellet* cellulare) mentre il DNA possa trovarsi in soluzione (sovrinatante). Il surnatante, pari a 160 μl per ogni coltura, contenente il DNA batterico estratto da processare per l' amplificazione, è stato aspirato e depositato in una nuova provetta opportunamente siglata.

Spoligotyping

Lo *Spoligotyping* è una tecnica di genotipizzazione molecolare introdotta nel 1993 ma sviluppata nel 1997 e più comunemente usata per caratterizzare gli isolati appartenenti a *M. tuberculosis complex*, partendo da DNA micobatterico estratto da colture solide o liquide mediante lisi al calore.

Tale metodica basata sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di amplificare nel DNA micobatterico il *locus* cromosomico DR (Fig. 18) contenente molteplici sequenze ripetute (DRs, *direct repeats*) di 36 paia di basi separate da 43 sequenze spaziatrici (*spacers*) non ripetitive della lunghezza di 36-41 paia di basi (129,130).

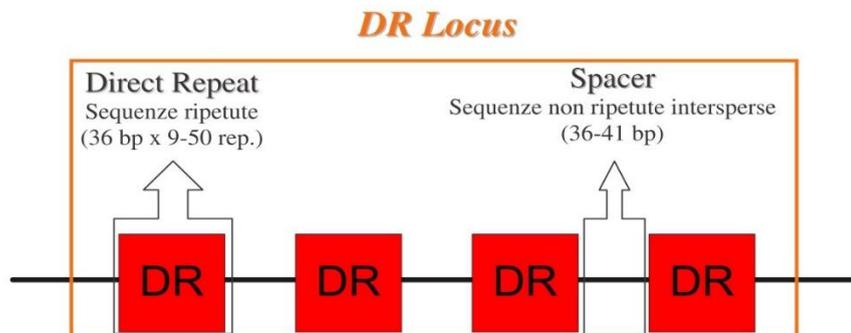


Figura 18. Rappresentazione del locus DR e della sua struttura. I box rossi corrispondono alle sequenze DR intervallate alle quali vi sono le cosiddette sequenze spaziatrici.

I ceppi di *M. tuberculosis* differiscono tra loro per il numero delle DRs e per la presenza/assenza delle sequenze spaziatrici. Il polimorfismo del *locus* DR, su cui si fonda lo *Spoligotyping*, è dovuto alla ricombinazione omologa tra DRs vicine o distanti ed al riarrangiamento guidato dalla sequenza di inserzione IS6110, la quale è presente nella regione DR della maggior parte dei ceppi di *M. tuberculosis* (Fig. 25).

Più nello specifico la variabilità della regione DR presa in considerazione è data dal fatto che possono verificarsi due possibili eventi di riarrangiamento genetico: la variazione di una o di poche ripetizioni contigue con la relativa sequenza *spacer* vicina, definita anche come *Direct Variable Repeats* (dovuta probabilmente proprio alla ricombinazione omologa tra DRs

cromosomiche adiacenti o distanti) e/o la delezione degli spacer guidata dalla trasposizione di un elemento IS6110 presente nel locus DR (98,107) (Fig.23).

Le ripetizioni DR non possono aggiungersi tra le sequenze, ma vengono perse irreversibilmente. (107) Gli eventi di delezione possono verificarsi più volte nel tempo e indipendentemente in ceppi non correlati; pertanto l'identico spoligotipo tra due ceppi può essere il risultato di un evento di evoluzione convergente (107,131).

Il primo step della metodica consiste nell'amplificazione del locus DR (Fig. 19) che avviene, per ogni campione, mediante una coppia di *primers* (DRa e DRb), uno dei quali biotinilato (DRa) all'estremità 5'.

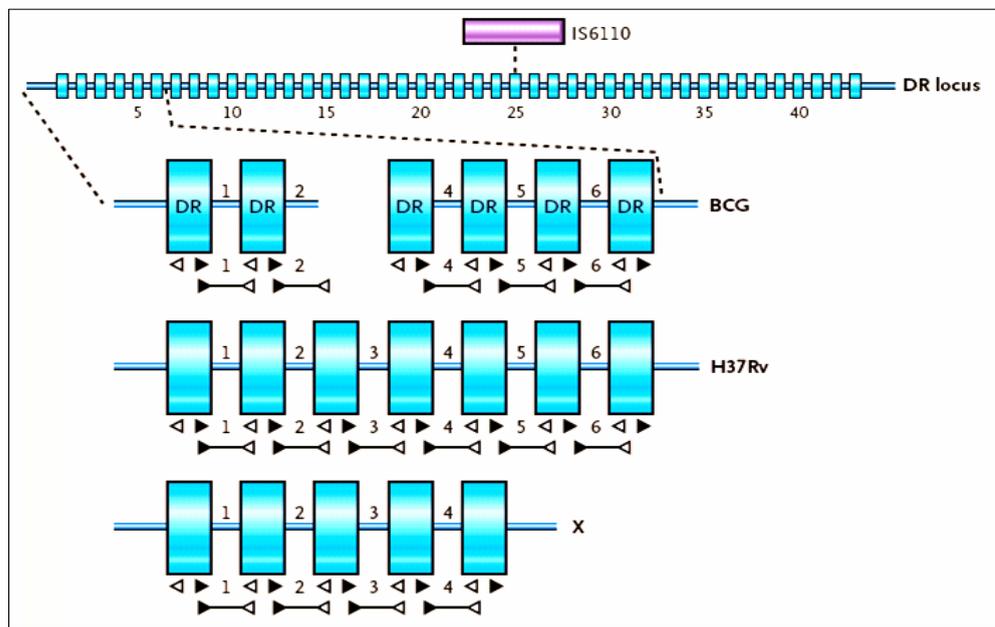


Figura 19. Differente distribuzione delle DR all'interno del locus DR di alcuni clade micobatterici.

Gli amplificati sono stati distribuiti singolarmente nei condotti di un *miniblotter* al fine di permettere l'ibridizzazione degli stessi con le sonde dei 43 oligonucleotidi specifici per ciascuno *spacer* precedentemente legati in modo covalente ad una membrana Biodyne C. Tale membrana di nitrocellulosa attivata sulla quale è avvenuta la reazione di ibridizzazione, è stata successivamente incubata con streptavidina perossidasi (POD-coniugate), la quale è in grado di riconoscere e legare la biotina presente nei prodotti di PCR (*reverse strand*) ottenuti al primo step (Fig.20).

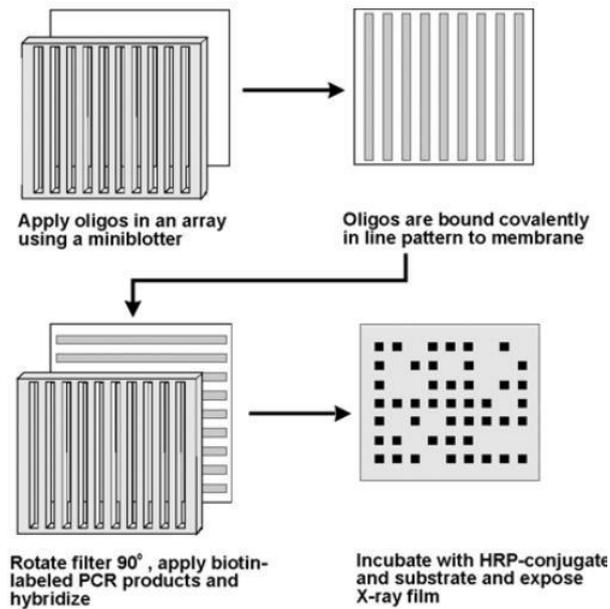


Figura 20. Schema di ibridizzazione su membrana e incubazione dei campioni di DNA amplificato.

La visualizzazione del segnale di ibridizzazione richiede una metodica di chemiluminescenza attraverso cui la perossidasi presente sulla streptavidina catalizza una reazione in grado di emettere luce, la quale impressiona una lastra fotografica mediante autoradiografia.

L'analisi finale consiste nella decodifica della lastra ottenuta secondo un preciso schema basato su un codice binario e in base otto.

La presenza o l'assenza del segnale relativo ad ogni *spacer* nell'immagine fotografica viene registrata secondo un codice binario ottenendo una stringa numerica di 43 cifre iniziali; il segnale positivo è associato alla visualizzazione del quadrato nero in corrispondenza dello *spacer* e ad esso si attribuisce un valore pari a 1. Al contrario l'assenza di segnale è considerato come mancanza di *spacer* e ad esso è associato il valore 0.

La stringa numerica di 43 cifre verrà poi suddivisa a triplete, ad eccezione dell'ultima, così da ridurre a 15 cifre l'intero campione secondo un octal code (Fig. 21).

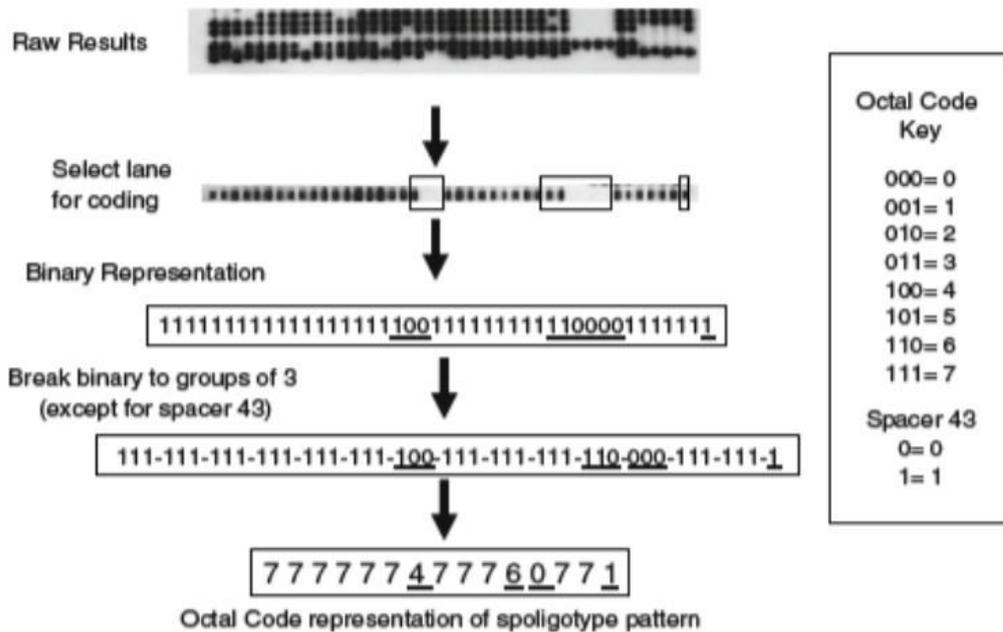


Figura 21. Modalità di decodifica degli Spoligotypes. L'assenza o presenza degli spacers viene visualizzata come assenza/presenza di box neri ai quali si associa rispettivamente valore 0 e 1. Il codice binario di 43 cifre viene poi decodificato in un nuovo codice a 15 cifre utilizzando un sistema in base otto.

L'assegnazione degli STs e l'appartenenza o meno a specifiche famiglie genotipiche è stata effettuata confrontando gli *Spoligotypes* con quelli presenti nel database internazionale *SpolDB4* (125,132) (Fig.22)

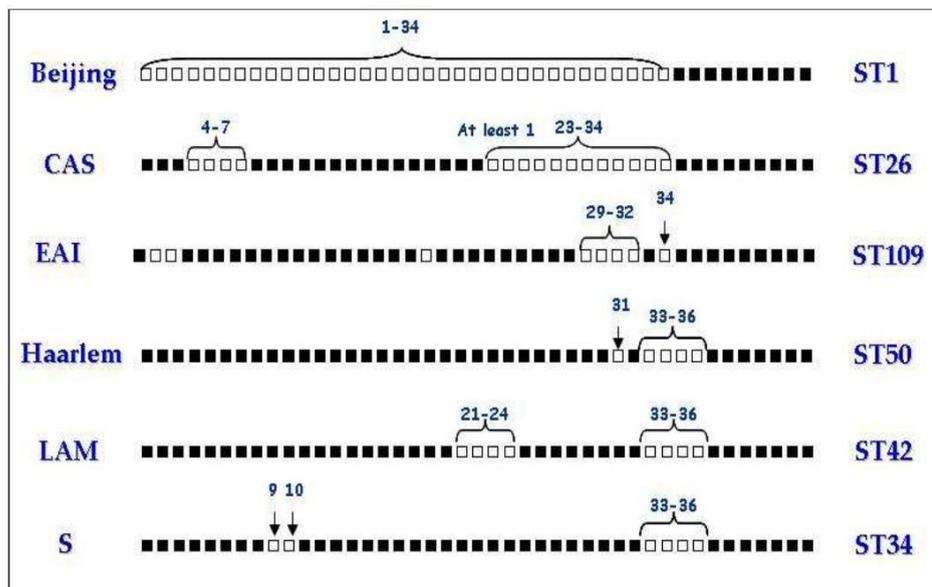


Figura 22. Rappresentazione dei principali lineage (as sinistra) con i rispettivi spoligo-pattern e il codice ST corrispondente (a destra).

Inserendo i pattern relativi ai propri campioni il database propone il *best match* con gli *spoligotypes* di riferimento presenti in memoria; ciò permette quindi un rapido riconoscimento dei *lineage* e *sub-lineage*.

Questa metodica risulta essere vantaggiosa in quanto i risultati sono altamente riproducibili ed i dati derivati, espressi in forma binaria, possono essere facilmente interpretati e possono consentire il confronto tra diversi laboratori. Inoltre lo *spoligotyping* richiede piccole quantità di DNA (circa due microgrammi di DNA micobatterico) e di conseguenza poco tempo per la crescita, seppur lenta, del campione, diversamente dalla IS6110 RFLP che necessita una maggiore quantità di materiale di partenza della coltura. Garantisce, poi, la simultanea identificazione e tipizzazione di più ceppi contemporaneamente appartenenti al *M. tuberculosis complex* con la distinzione di *Mycobacterium bovis* da *M. tuberculosis*.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS (versione 20.0, Chicago, Illinois, USA). Le variabili continue sono state rappresentate come media \pm DS e range.. Il confronto di variabili categoriche tra i 4 gruppi, scegliendo come riferimento la localizzazione polmonare, è stato eseguito mediante analisi multinomiale univariata. L'odds ratio (ed il suo intervallo di confidenza al 95%) è stato calcolato quale stima del rischio relativo. Sono state analizzate le variabili per cui erano disponibili i dati per almeno il 90% dei pazienti (età, sesso, nazionalità, sierologia per HIV, positività all'esame microscopico, antibiogramma). L'effetto di ciascuna variabile significativa sul rischio di avere una forma di tubercolosi a localizzazione polmonare stato testato dapprima separatamente e poi congiuntamente in un modello di regressione logistica multipla. Un valore di $p < 0,05$ è stato scelto come valore soglia di significatività statistica.

2.4 RISULTATI

La popolazione dello studio comprende 1579 soggetti con diagnosi accertata di tubercolosi. I pazienti di sesso maschile corrispondono a 958 (60,7%), i restanti di sesso femminile sono 621 (39,3%). L'età media (\pm DS) dell'intera popolazione è di $43,5 \pm 19,8$ anni (mediana 38 anni, range 1-96). I pazienti immigrati presentano tuttavia alla diagnosi di malattia un'età significativamente inferiore se confrontati agli italiani ($32,2$ vs $55,7$). Rispetto all'origine geografica (Fig. 23) gli italiani sono 814 (51,6%), gli immigrati 765 (48,4%), dei quali 252 di origine sudamericana (16,0%), 225 africani (14,2%), 163 asiatici (10,3%), 125 provenienti dall'Est Europa (7,9%).

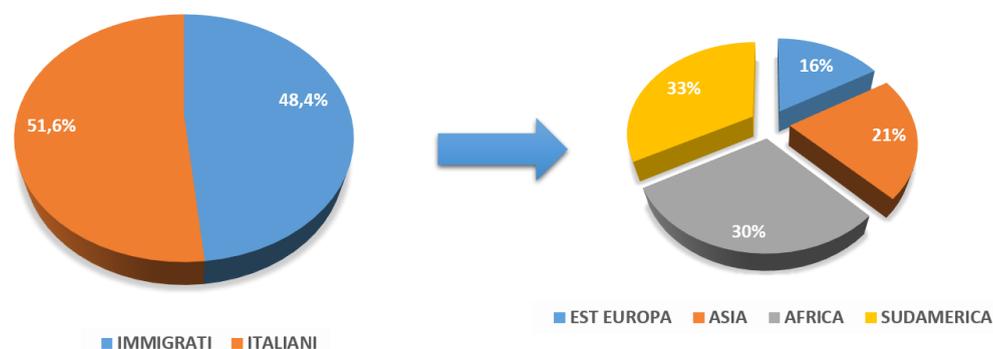


Figura 23. Distribuzione percentuale dei casi secondo l'origine geografica (grafico a torta a sinistra) con dettaglio della provenienza secondo le macro aree geografiche (grafico a torta a destra) per la popolazione immigrata.

La proporzione di casi di tubercolosi nella popolazione autoctona si è progressivamente ridotta a favore di quella immigrata durante l'intero periodo di studio. Se nel periodo 1996-1998 il 65,7% delle diagnosi veniva posta negli italiani, nel biennio 2008-2010 tale percentuale si è ridotta al 37,2% (Fig. 24)

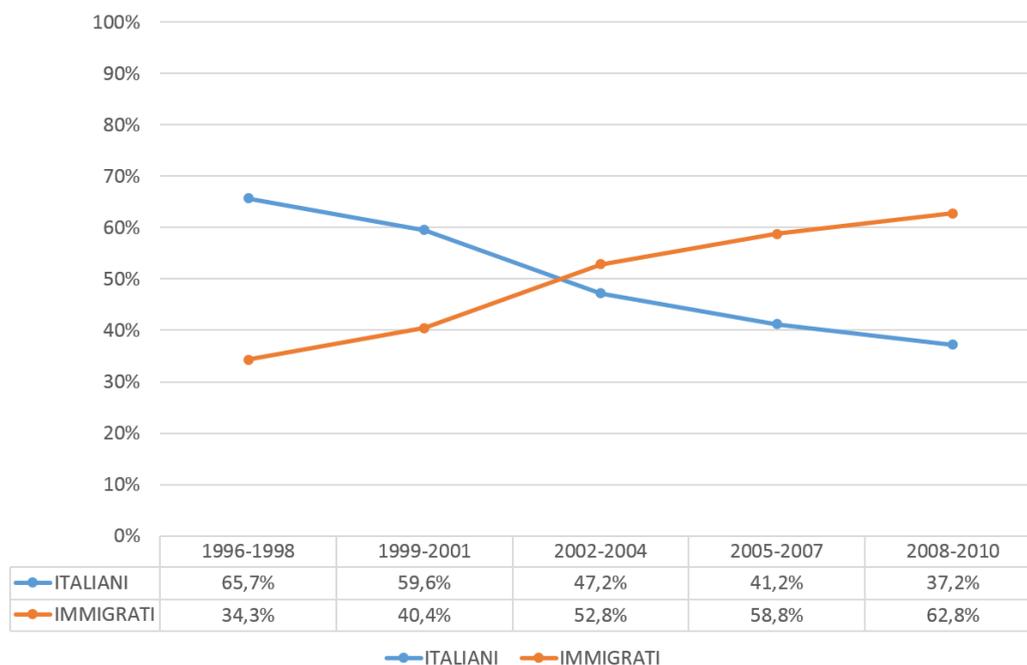


Figura 24. Distribuzione dei casi di TB fra immigrati e italiani nel periodo di tempo considerato. Si osserva una inversione di tendenza nella proporzione dei casi con costante prevalenza della popolazione immigrata a partire dal terzo triennio (2002-2004).

Analizzando i flussi migratori nel tempo si osserva una sostanziale prevalenza di immigrati originari dell’America Latina e del continente africano, una proporzione crescente degli immigrati di origine asiatica accanto ad un ancor più eclatante incremento di soggetti provenienti dall’Est Europa (Fig. 25).

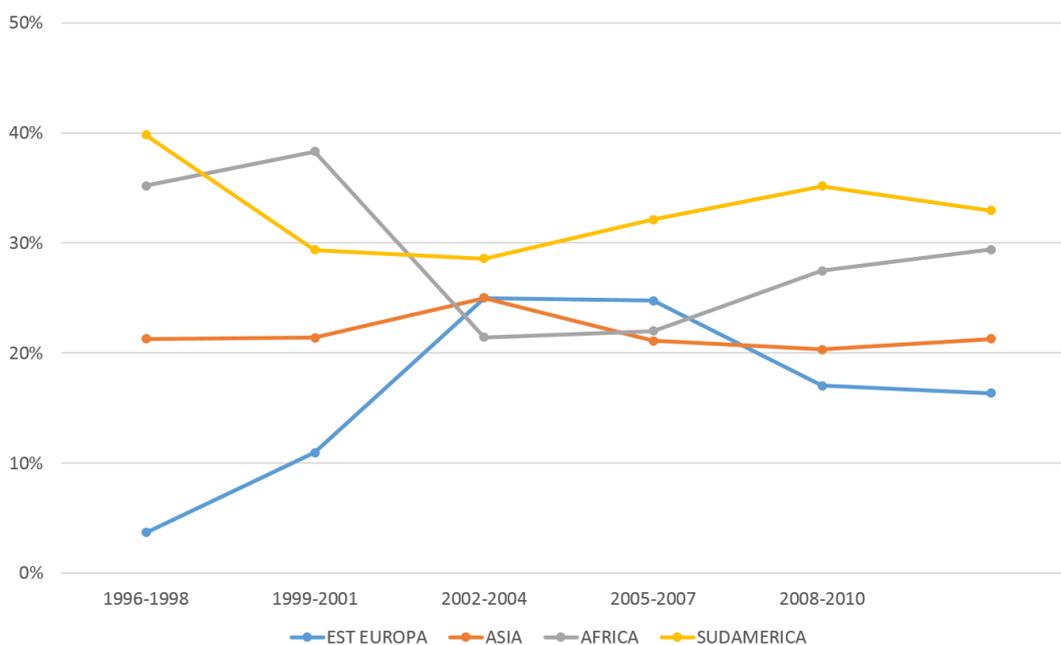


Figura 25. Distribuzione dei casi di TB nella popolazione immigrata in ogni triennio in relazione all’area geografica di provenienza.

La ricerca di bacilli acido-alcol resistenti è risultata positiva in 1076/1499 (71,8%) casi (Fig. 26a). Rispetto al profilo di sensibilità farmacologica (Fig. 26b) 1481/1545 (95,9%) casi sono risultati pan-sensibili o con una monoresistenza mentre 64 sono forme MDR (4,1%).

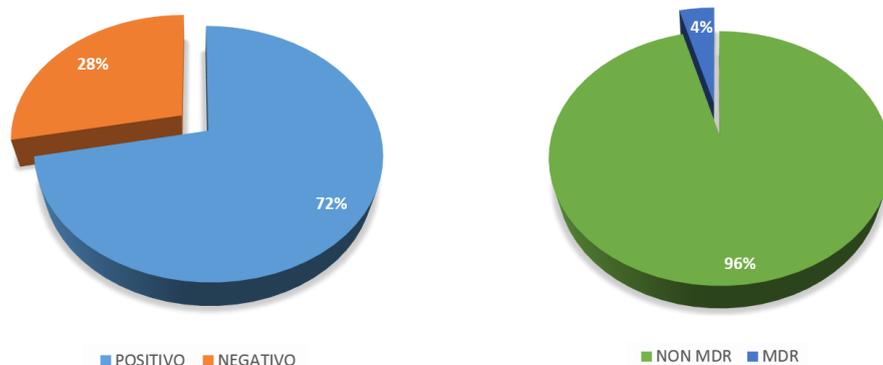


Figura 26a e 26b. Profilo di resistenza all'antibiogramma di prima linea degli isolati clinici di *M. tuberculosis*.

I soggetti di cui è noto lo stato sierologico per anticorpi anti-HIV sono pari a 1579 di cui 126 (8,0%) co-infetti (Fig. 27a). Dopo un'iniziale e significativo ($p=0,025$) decremento dei casi di co-infezione alla fine degli anni Novanta, la percentuale di è rimasta stabile negli anni cui è seguito una seppur modesta inversion di tendenza nell'ultimo triennio (Fig.27b).

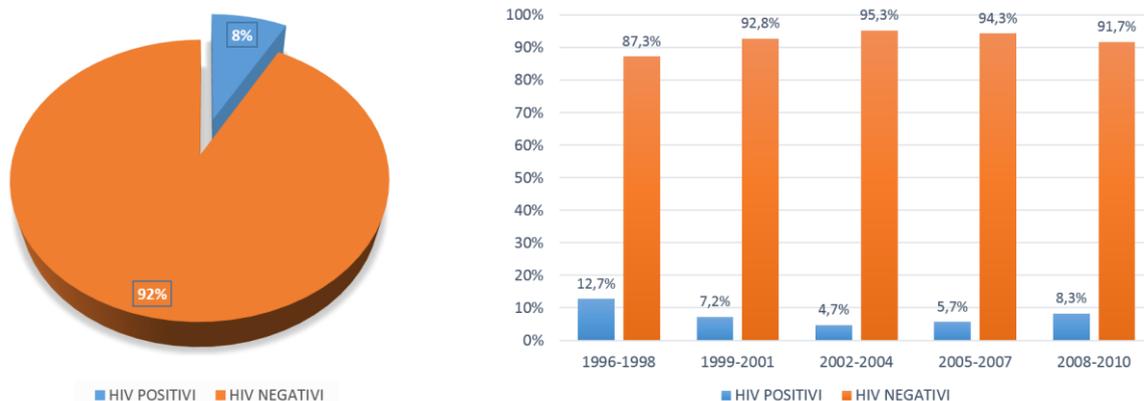


Figura 27a e 27b. Stato sierologico per infezione da HIV-1 della popolazione in studio. In rosso i soggetti co-infetti, la cui percentuale si è ridotta nel tempo.

Nel descrivere la popolazione dello studio si sono considerati per ogni variabile solo i casi con dato disponibile, indicando invece in tabella anche la proporzione dei casi con dato mancante. Secondo i criteri esposti precedentemente la popolazione dello studio è stata stratificata in quattro gruppi in relazione alla localizzazione di malattia: polmonare, extrapolmonare non linfonodale, linfonodale e disseminate.

I casi di tubercolosi polmonare sono nettamente prevalenti con 1219 episodi (77,2%), le forme extra- polmonari non linfonodali sono 130 (8,2%), quelle linfonodali ammontano a 115 (7,3%) tanto quanto quelle disseminate (7,3%). Tra le forme extrapolmonari non linfonodali in ordine decrescente le più frequenti sono quelle a localizzazione genito-urinaria (42,3%), ossea (23,1%) e a livello del SNC (14,6%) (Fig. 28).

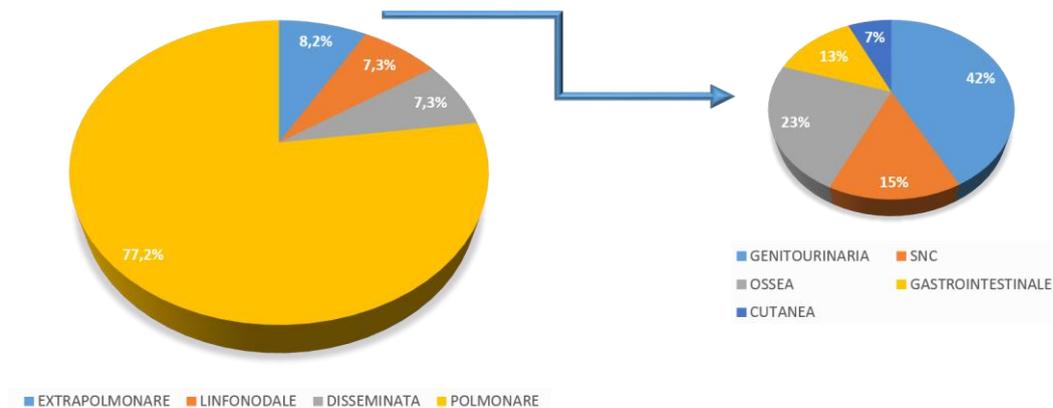


Figura 28. Rappresentazione percentuale dei casi di tubercolosi per forma (grafico a torta a sinistra) con dettaglio di localizzazione per le forme extra-polmonari (grafico a barre a destra).

La proporzione di tubercolosi polmonare nel periodo di osservazione è rimasta pressochè invariata nei primi 4 trienni con una modesta deflessione nell'ultimo a favore di un incremento delle forme disseminate passate dal 5,7% del primo triennio al 9% dell'ultimo. Le forme a localizzazione linfonodale si sono mantenute stabili percentualmente a differenza di quelle extrapolmonari non linfonodali, il cui andamento ha riconosciuto un trend decrescente sino al terzo triennio con una sensibile inversione di tendenza in crescendo nei due trienni successivi. Tali variazioni nel tempo tuttavia non raggiungono la significatività statistica ($p=0,28$; Fig. 29).

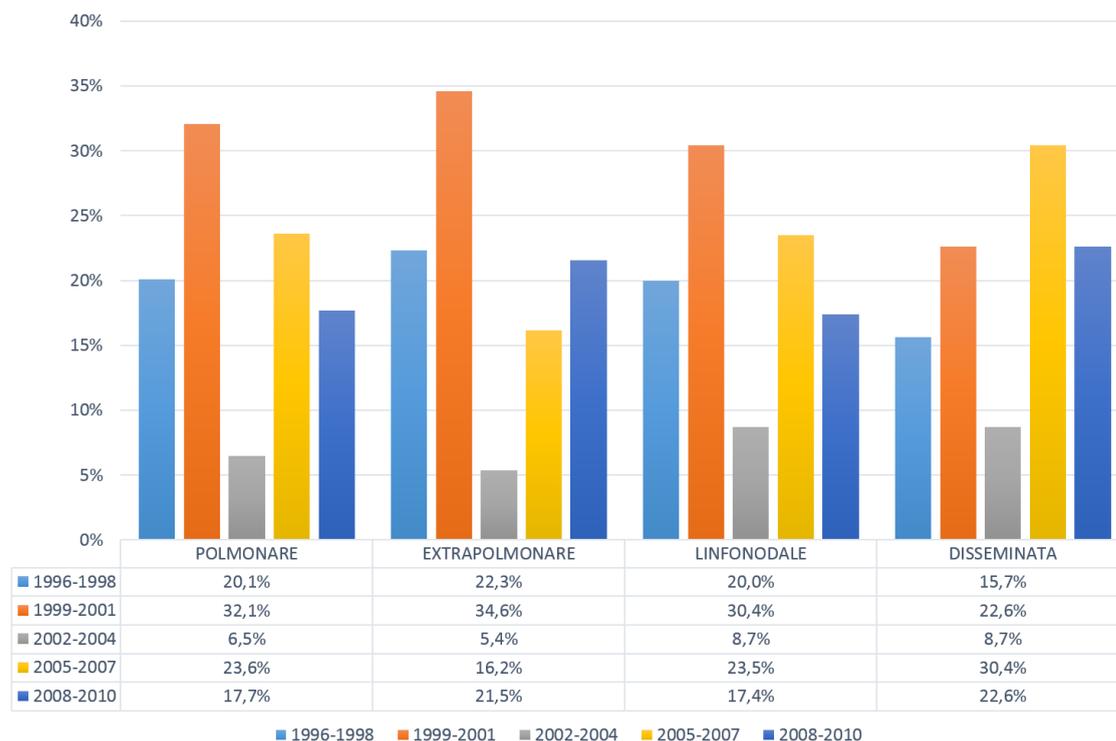


Figura 29. Rappresentazione percentuale dei casi di tubercolosi per forma rispetto ai 5 trienni di studio.

I risultati dell'analisi multinomiale sono rappresentati nelle tabelle 9-14. Prendendo come categoria di riferimento le tubercolosi a localizzazione polmonare si osserva come i pazienti di sesso femminile siano proporzionalmente superiori nelle forme linfonodali (1,52 [1,04-2,23] $p < 0,032$). I soggetti con età superiore ai 50 anni sono significativamente prevalenti tra le forme extrapolmonari non linfonodali (2,46 [1,67-3,63] $p < 0,0001$) a differenza di quelle disseminate (0,53 [0,33-0,85] $p < 0,008$).

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	SESSO FEMMINILE	1,29 [0,90-1,86]	0,168
LINFONODALE		1,52 [1,04-2,23]	0,032
DISSEMINATA		0,82 [0,55-1,23]	0,345

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	ETA' >50	2,46 [1,67-3,63]	0,0001
LINFONODALE		0,77 [0,48-1,25]	0,291
DISSEMINATA		0,53 [0,33-0,85]	0,008

Tabella 9 e 10. Analisi multinomiale riferita alle variabili sesso (M vs F) ed età (<50 vs >50). Categoria di riferimento tubercolosi polmonare. Significatività per $p < 0,05$.

Rispetto alla nazionalità i pazienti africani e asiatici risultano più rappresentati nelle forme linfonodali (3,35 [2,08-5,40] $p < 0,0001$; 2,02 [1,12-3,65] $p < 0,02$) e disseminate (3,03 [1,78-5,16] $p < 0,0001$; 2,60 [1,43-4,72] $p < 0,002$) così come i sudamericani ma esclusivamente in quest'ultima localizzazione (2,71 [1,63-4,50] $p < 0,0001$).

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	EST EUROPA	0,12 [0,03-0,51]	0,004
	ASIA	0,48 [0,22-1,01]	0,052
	AFRICA	0,72 [0,40-1,28]	0,259
	SUDAMERICA	0,56 [0,32-0,99]	0,044
LINFONODALE	EST EUROPA	0,37 [0,11-1,21]	0,099
	ASIA	2,02 [1,12-3,65]	0,020
	AFRICA	3,35 [2,08-5,40]	0,0001
	SUDAMERICA	1,11 [0,61-2,04]	0,726
DISSEMINATA	EST EUROPA	0,60 [0,21-1,71]	0,338
	ASIA	2,60 [1,43-4,72]	0,002
	AFRICA	3,03 [1,78-5,16]	0,0001
	SUDAMERICA	2,71 [1,63-4,50]	0,0001

Tabella 11. Analisi multinomiale riferita alla variabile origine geografica (Italiani vs altre nazionalità). Categoria di riferimento tubercolosi polmonare. Significatività per $p < 0,05$.

Non sussiste alcuna differenza rispetto alla positività all'esame microscopico diretto rispetto alla sede di malattia.

Tutte le forme a localizzazione non polmonare si caratterizzano per una quota proporzionalmente superiore di pazienti coinfecti ma l'unica corroborata da significatività statistica è la localizzazione disseminata (5,71 [3,55-9,18] $p < 0,0001$). Non sussiste alcuna differenza tra le 4 forme rispetto al profilo di sensibilità farmacologica.

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	HIV POSITIVITA'	1,57 [0,83-2,98]	0,164
LINFONODALE		1,31 [0,64-2,70]	0,458
DISSEMINATA		5,71 [3,55-9,18]	0,0001

Tabella 12. Analisi multinomiale riferita alla variabile infezione da HIV (neg vs pos). Categoria di riferimento tubercolosi polmonare. Significatività per $p < 0,05$.

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	ESAME MICROSCOPICO NEGATIVO	0,79 [0,51-1,23]	0,301
LINFONODALE		1,04 [0,67-1,61]	0,868
DISSEMINATA		1,22 [0,80-1,86]	0,357

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	ANTIBIOGRAMMA MDR	nv	
LINFONODALE		0,35 [0,08-1,44]	0,146
DISSEMINATA		0,34 [0,08-1,42]	0,139

Tabella 13 e 14. Analisi multinomiale riferita alle variabili esame microscopico (pos vs neg) e antibiogramma (no MDR vs MDR). Categoria di riferimento tubercolosi polmonare. Significatività per $p < 0,05$.

I risultati dell'analisi multivariata sono esposti nelle tabelle 15-17. Un'età > 50 anni si associa in modo significativo a forme di tubercolosi extrapolmonare non linfonodale (2,41 [1,45-4,02] $p < 0,001$). Rispetto al genere, il sesso femminile si associa in modo nettamente significativo alle tubercolosi linfonodali (1,80 [1,20-2,70] $p < 0,005$). Il rischio di sviluppare tubercolosi linfonodale è più che quadruplicate per i pazienti di origine africana (4,62 [2,52-8,46] $p < 0,0001$), mentre i pazienti provenienti dall'Est Europa presentano un rischio maggiore di avere tubercolosi con localizzazione polmonare. I soggetti asiatici (3,39 [1,56-7,36] $p < 0,002$), africani 3,48 [1,83-6,64] $p < 0,0001$ e sudamericani 1,97 [1,06-3,66] $p < 0,031$) hanno un rischio significativamente superiore di sviluppare forme disseminate.

Per i soggetti con infezione da HIV il rischio di avere una tubercolosi a localizzazione diversa da quella polmonare è significativamente superiore: circa raddoppiato per le forme linfonodali (2,18 [0,99-4,80] $p < 0,053$) e superiore a sei volte per quelle disseminate (6,63 [3,79-11,57] $p < 0,0001$). Per le forme extrapolmonari a localizzazione del SNC e gastrointestinale esiste una significativa associazione con l'infezione da HIV (7,88 [3,07-20,23] $p < 0,0001$) che non si riscontra nelle forme genito-urinarie e ossee (0,74 [0,21-2,52] $p < 0,65$).

Le forme polmonari sono significativamente associate a un maggior rischio di multifarmaco-resistenza rispetto a quelle disseminate (0,21 [0,05-0,92] $p < 0,039$).

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
LINFONODALE	FEMMINE	1,80 [1,20-2,70]	0,005
	ETA' > 50	1,48 [0,81-2,69]	0,205
	EST EUROPA	0,48 [0,14-1,65]	0,244
	ASIA	1,77 [0,83-3,79]	0,140
	AFRICA	4,62 [2,52-8,46]	0,0001
	SUDAMERICA	1,38 [0,68-2,80]	0,376
	ESAME MICROSCOPICO NEGATIVO	1,14 [0,72-1,81]	0,576
	ANTIBIOGRAMMA MDR	0,30 [0,07-1,30]	0,108
	HIV POSITIVITA'	2,18 [0,99-4,80]	0,053

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE NON LINFONODALE	FEMMINE	1,33 [0,90-1,95]	0,152
	ETA' > 50	2,41 [1,45-4,02]	0,001
	EST EUROPA	0,21 [0,05-0,89]	0,034
	ASIA	0,74 [0,30-1,85]	0,522
	AFRICA	1,24 [0,63-2,46]	0,535
	SUDAMERICA	0,91 [0,46-1,79]	0,786
	ESAME MICROSCOPICO NEGATIVO	0,67 [0,43-1,06]	0,09
	ANTIBIOGRAMMA MDR	NV	
	HIV POSITIVITA'	2,35 [1,16-4,77]	0,018

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
DISSEMINATA	FEMMINE	1,04 [0,68-1,61]	0,849
	ETA' > 50	1,10 [0,60-2,00]	0,756
	EST EUROPA	0,56 [0,19-1,72]	0,316
	ASIA	3,39 [1,56-7,36]	0,002
	AFRICA	3,48 [1,83-6,64]	0,0001
	SUDAMERICA	1,97 [1,06-3,66]	0,031
	ESAME MICROSCOPICO NEGATIVO	1,24 [0,79-1,94]	0,357
	ANTIBIOGRAMMA MDR	0,21 [0,05-0,92]	0,039
	HIV POSITIVITA'	6,63 [3,79-11,57]	0,0001

Tabella 15-17. Analisi multivariata, fattori di rischio per singola localizzazione. OR= Odds Ratio, IC=intervallo di confidenza. Significatività per $p < 0,05$.

Dei 1579 isolati clinici di *M. tuberculosis*, sulla base dello *spoligopattern*, 1420 (89,9%) sono univocamente associabili ad un ST noto, distribuiti a loro volta in 13 *lineage* principali. La famiglia genotipica maggiormente rappresentata è T con 518 isolati (36,4%), seguita dalle famiglie H, Latin And Mediterranean, U e Beijing rispettivamente comprendenti 235 (16,5%), 209 (14,7%), 153 (10,8%) e 93 (6,5%) ceppi (Fig.30). Questi cinque *lineage* aggregano complessivamente l'85% degli isolati sottoposti a caratterizzazione genotipica.

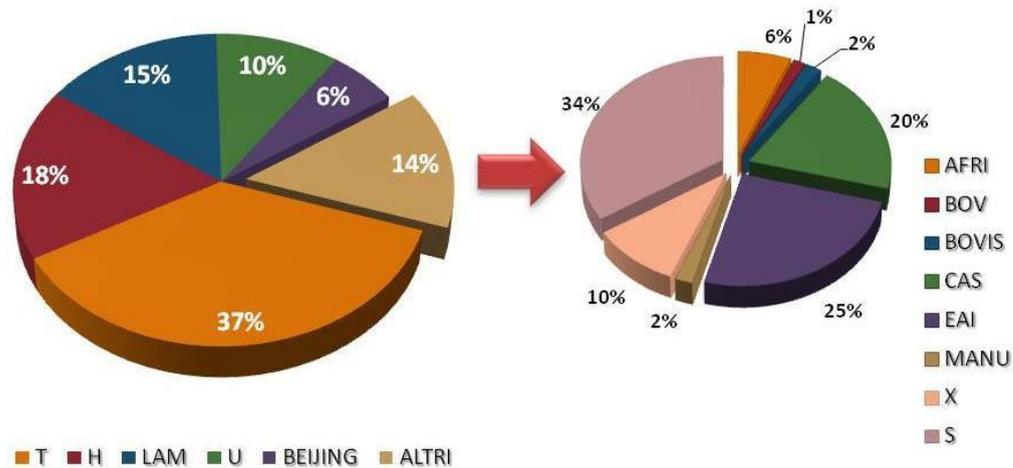


Figura 30. Distribuzione percentuale delle principali famiglie genotipiche di *M. tuberculosis* sulla base dello spoligo-pattern.

Suddividendo le famiglie in 5 macro-lineage filogenetici (138), nel periodo di osservazione dello studio la proporzione di isolati appartenenti alle famiglie T, H, LAM e U si è progressivamente ridotta passando dal 71,7% del primo triennio al 64,8% dell'ultimo. E' aumentata in modo significativo la rappresentatività delle famiglie Beijing (OR=2,17 p<0,034), così come hanno conosciuto un incremento le famiglie EAI e CAS con un trend che tuttavia non si è confermato statisticamente significativo.

Stratificando i lineage di appartenenza con le sedi di malattia emergono delle differenze peculiari. Sia dall'analisi multinomiale univariata che da quella multivariata non emerge alcuna differenza significativa riguardo alla tendenza ad aggregarsi in cluster. Rispetto ai lineage all'analisi multinomiale univariata (Tab. 18) si osserva invece come le forme linfonodali siano preferenzialmente sostenute da ceppi appartenenti a tre famiglie: EAI (3,40 [1,16-9,95] p<0,025), CAS (6,61 [2,31-18,93] p<0,0001) e Beijing (2,55 [0,93-7,00] p<0,06) seppur quest'ultimo ai limiti della significatività statistica.

Dall'analisi multivariata (Tab 19) si conferma la stessa associazione tra i lineage EAI (3,78 [1,08-13,26] p<0,038), Beijing (3,94 [1,15-13,51] p<0,029) e CAS (4,64 [1,38-15,61] p<0,013) e la localizzazione linfonodale.

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	EAI	1,06 [0,36-3,13]	0,912
	BEIJING	0,26 [0,06-1,16]	0,076
	CAS	0,66 [0,14-3,08]	0,598
	H-T-LAM-X	0,97 [0,53-1,76]	0,910
	U-S	1,14 [0,57-2,29]	0,713
LINFONODALE	EAI	3,40 [1,16-9,95]	0,025
	BEIJING	2,55 [0,93-7,00]	0,069
	CAS	6,61 [2,31-18,93]	0,0001
	H-T-LAM-X	1,49 [0,67-3,33]	0,330
	U-S	1,52 [0,61-3,80]	0,371
DISSEMINATA	EAI	1,08 [0,33-3,58]	0,897
	BEIJING	1,79 [0,74-4,33]	0,199
	CAS	0,84 [0,18-4,02]	0,829
	H-T-LAM-X	0,99 [0,51-1,93]	0,983
	U-S	1,21 [0,56-2,61]	0,629

Tabella 18. Analisi multinomiale riferita alla variabile *lineage* (orfani vs lineage). Categoria di riferimento tubercolosi polmonare. Significatività per $p < 0,05$.

SEDE	VARIABILE	OR (IC 95%)	P
EXTRAPOLMONARE	EAI	1,67 [0,46-6,05]	0,434
	BEIJING	0,61 [0,12-3,14]	0,550
	CAS	0,93 [0,18-4,86]	0,928
	H-T-LAM-X	1,20 [0,55-2,60]	0,645
	U-S	1,40 [0,60-3,24]	0,433
LINFONODALE	EAI	3,78 [1,08-13,26]	0,038
	BEIJING	3,94 [1,15-13,51]	0,029
	CAS	4,64 [1,38-15,61]	0,013
	H-T-LAM-X	1,83 [0,69-4,86]	0,223
	U-S	1,97 [0,69-5,66]	0,208
DISSEMINATA	EAI	0,48 [0,12-2,03]	0,322
	BEIJING	0,80 [0,24-2,68]	0,718
	CAS	0,33 [0,06-1,84]	0,205
	H-T-LAM-X	0,71 [0,27-1,81]	0,468
	U-S	1,00 [0,37-2,74]	0,994

Tabella 19. Analisi multivariata, riferita alla variabile *lineage*. Significatività per $p < 0,05$.

2.5 DISCUSSIONE

Il quadro epidemiologico e demografico della tubercolosi nell'area urbana di Milano che emerge dal nostro studio ricalca sostanzialmente quello delle grandi metropoli dei paesi occidentali. E' una patologia che prevale sostanzialmente nel sesso maschile, interessa una fascia di età attorno ai 40 anni, nonostante emerga una differenza significativa se si confronta la popolazione immigrata con quella italiana. Nella prima sono i soggetti più giovani ad essere maggiormente affetti (espressione pertanto di infezioni acquisite di recente) nella seconda sono invece gli adulti cinquantenni a costituire il gruppo a maggior rischio (espressione di riattivazione di infezioni latenti). Nel tempo si è inoltre osservata una significativa e consolidata inversione del rapporto nella proporzione di casi tra italiani e stranieri a favore di questi ultimi. Tale dato è espressione sostanzialmente di due aspetti: da un lato è diretta conseguenza di una crescente ondata migratoria che ha investito il nostro Paese e in particolar modo Milano, a partenza da aree geografiche quali l'Europa dell'Est, le Ex Repubbliche sovietiche e l'Asia che rientrano nei cosiddetti paesi *High Burden Tuberculosis* con i tassi di incidenza e prevalenza più elevati globalmente. Dall'altro lato un maggior coinvolgimento della popolazione immigrata conferma ancora una volta di più come la tubercolosi colpisca i gruppi più fragili della popolazione che versano in condizioni socio-economiche spesso sfavorevoli. Fenomeni che si sono progressivamente attenuate nel tempo sono la multi-farmacoresistenza e la co-infezione tubercolosi HIV. Nell'era pre-HAART i due fenomeni sono stati strettamente interdipendenti. Questo risultato può essere interpretato come diretta conseguenza di un approccio terapeutico perfezionato e di una maggior aderenza terapeutica, ma più ragionevolmente è il risultato di un ridimensionamento delle epidemie ospedaliere da ceppi MDR tra pazienti HIV-positivi, verificatosi negli anni '80, quando una terapia ad alta efficacia per l'HIV non era ancora disponibile ed era diffuso il sovraffollamento di questi malati nei reparti di Malattie Infettive in condizioni di promiscuità. Questa ipotesi trova valido fondamento nell'assenza di fenomeni di aggregazione in cluster tra i casi di tubercolosi MDR, il che esclude la diffusione di microepidemie sostenute da ceppi multiresistenti.

La finalità del nostro studio verte sulla ricerca di fattori di carattere epidemiologico, demografico e clinico-microbiologico sufficientemente peculiari da distinguere in modo significativo la tubercolosi a seconda della sede di malattia. I risultati ottenuti dal nostro

studio nella popolazione di riferimento nel periodo di tempo considerato risponde a tale scopo. Complessivamente possiamo affermare che la tubercolosi a localizzazione extrapolmonare e disseminata si differenziano in modo sostanziale dalla più classica localizzazione polmonare. All'interno dell'eterogeneo gruppo delle tubercolosi extrapolmonari si evidenziano inoltre delle peculiarità per quanto concerne le forme esclusivamente linfonodali rispetto a quelle ad altra sede.

La tubercolosi extrapolmonare linfonodale si caratterizza per essere prevalente tra i pazienti di sesso femminile, con una giovane età alla diagnosi, preferenzialmente di origine Africana e tra i soggetti HIV positivi.

L'associazione tra sesso femminile e tubercolosi extrapolmonare è un dato già riportato in altri studi epidemiologici (136). La ragione di tale correlazione non è nota e meritevole di ulteriori approfondimenti a fronte soprattutto di un dato epidemiologico generale di prevalenza della tubercolosi nel sesso maschile con un rapporto di 1.9. E' ipotizzabile che il patrimonio genetico, in termini di espressione di varianti alleliche, nonché fattori ormonali sesso specifici, oltre che fattori di carattere sociale, economico, culturale possano modulare significativamente tale associazione.

La correlazione tra età e sede di malattia nel nostro studio evidenzia una prevalenza significativa di giovani nelle forme linfonodali, risultato in linea con quanto emerge da numerosi studi (136-138). Nel lavoro di Lin et (137) si viene indicato una riduzione del rischio di tubercolosi extrapolmonare del 15% per ogni decade di vita.

L'origine geografica emerge come fattore indipendentemente associato alla sede di malattia tubercolare. In particolar modo i soggetti provenienti dall'Est Europa presentano un rischio maggiore di sviluppare forme polmonari, quelle linfonodali risultano significativamente prevalenti nei pazienti di origine africana mentre quelle disseminate si associano all'origine asiatica, sudamericana e africana. Il dato risulta coerente con il quadro epidemiologico di tali aree geografiche documentato anche dall'ultimo rapporto dell'organizzazione mondiale della sanità. In setting socio-demografici disagiati come quelli dei paesi cosiddetti *High burden* il ritardo diagnostico e una inadeguata offerta terapeutica potrebbero essere cause favorevoli la progressione di malattia a sedi extrapolmonari o in forme puramente disseminate. Nondimeno il ritardo diagnostico-terapeutico si osserva frequentemente anche nel paese di emigrazione, tra gli immigrati a minor tasso di integrazione sociale. Non ultimo è necessario considerare anche il patrimonio allelico di ogni etnia che costituisce un fattore modulante nell'immunopatogenesi della tubercolosi e nella interazione ospite-

microrganismo.

Il nostro studio conferma una ben nota correlazione tra l'infezione da HIV e la tubercolosi non polmonare ponendosi in linea con quanto emerso da precedenti studi. L'immunodepressione indotta da HIV con un deficit dell'immunità cellulo-mediata costituisce una condizione necessaria e sufficiente per la disseminazione della tubercolosi in sede extrapolmonare, preferenzialmente linfonodale, rispetto alla popolazione immunocompetente. La enucleazione delle forme extrapolmonari del SNC e gastrointestinali dalle altre localizzazioni (genitourinarie e osse) ha fatto emergere nel nostro studio un dato particolarmente interessante. Sussiste infatti nella popolazione HIV positiva un rischio quasi sei volte superiore di sviluppare una tubercolosi extrapolmonare in tali sedi, quasi pari al rischio delle forme disseminate alle quali a ragion veduta le forme a sede nel SNC e gastrointestinale possono essere pertanto assimilate.

Un aspetto innovativo del nostro studio consiste nell'analisi di associazione tra genotipo infettante di *M. tuberculosis* e sede di malattia. Le metodiche di tipizzazione molecolare in particolar modo lo Spoligotyping hanno inequivocabilmente evidenziato come la specie *M. tuberculosis* sia costituita da numerosi *lineage* filogeneticamente divergenti espressione dell'evoluzione genetica nel tempo. Sono state individuate famiglie genotipiche principali che si caratterizzano per una specifica distribuzione geografica, alcune delle quali ubiquitarie come Haarlem, T, U, altre più correlate ad una realtà geografica ben definite come Beijing, CAS, LAM, EAI. Tale distribuzione è in parte dipendente dalla co-evoluzione avvenuta insieme al genere umano. Diversi studi hanno messo in rilievo una particolare associazione tra genotipo e caratteristiche quali la farmaco-resistenza o la capacità di generare fenomeni epidemici. Fino ad oggi pochi studi con casistiche limitate e risultati tra loro contrastanti si sono dedicati a valutare un aspetto poco indagato, ovvero l'associazione tra genotipo e l'espressione clinica della tubercolosi. Dal nostro studio emerge come tre genotipi, EAI, CAS e Beijing si associano in modo significativo a localizzazione extrapolmonare linfonodale di malattia. Tale risultato risulta coerente con quanto pubblicato in un recente studio del 2012 di Click (138) et al nel quale è stata identificata una significativa associazione tra il lineage CAS ed EAI e la tubercolosi extrapolmonare. Ad analoga conclusione giungono altri studi di cui uno condotto in Italia. Risultati più contrastanti emergono dalla Letteratura per quanto concerne il genotipo Beijing. In alcuni studi, tra i quali il

suddetto (138) e uno condotto a Londra, si delinea una associazione significativa con la sede polmonare, in altri condotti uno in Arkansas ed un altro a Cape Town invece si rileva una associazione con la localizzazione extrapolmonare. Una maggiore tendenza di un lineage a determinare forme polmonare, capace pertanto di maggiore diffusibilità, costituisce un aspetto di interesse ancora più spiccato se riferito ad un genotipo come il Beijing caratterizzato da una maggiore virulenza e da profili di farmacoresistenza. In altri termini questo si traduce in un vantaggio di espansione clonale di un ceppo rispetto agli altri. Il nostro studio a differenza dei precedenti introduce una ulteriore variante meritevole di interesse ovvero la enucleazione delle forme esclusivamente linfonodali da quelle ad altra sede extrapolmonare. I genotipi EAI, CAS e Beijing sembrano prediligere proprio tale sede extrapolmonare rispetto a quella del SNC, ossea o gastrointestinale.

Il nostro studio, seppur limitato ad una specifica realtà territoriale, contribuisce in modo significativo alle crescenti evidenze secondo le quali differenti lineage di *M. tuberculosis* correlano con aspetti clinici ed epidemiologici peculiari. Dati che supportano l'ipotesi di una associazione tra *lineage* e sede di malattia promuovono ulteriore interesse per studi finalizzati a valutare se i genotipi infettanti possono anche differire per quanto riguarda altre caratteristiche, quali patogenicità, contagiosità, la progressione di malattia attiva, la risposta alla terapia farmacologica, lo sviluppo di resistenza ai farmaci e risposta a nuovi vaccini. È importante sottolineare che tali risultati potrebbero fornire la base per una migliore comprensione della patogenesi della malattia tubercolare e contribuire ad un approccio più raffinato per il controllo della tubercolosi a livello globale, dalla diagnosi al trattamento e alla prevenzione.

3. Bibliografia

1. E.Tortoli, MD Cirilli, *Microbiologia Clinica*, Ed. 2008.
 2. I. Smith, *Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence*, *Clinical Microbiology Reviews* 2003; 16(3), 463-496
 3. Moroni M, Esposito R, De Lalla F. *Malattie infettive*. Masson 2003; 429-438.
 4. Cavallo G. *Compendio di microbiologia generale e medica*. Edizioni libreria Cortina; 515-533.
 5. Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003; 83: 91-97)
 6. McNeil M. Targeted preclinical drug development for *Mycobacterium avium* complex: a biochemical approach. *Mycobacterium Avium Complex Infection*. Edited by Korvick JA, Benson CA. New York: Marcel Dekker Inc; 1996:263-263.
 7. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 29-63).
- Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 29-63).
8. Beckman EM, Melin A, Behar SM, Sieling PA, Chatterjee D, Furlong ST, Matsumoto R, Rosat JP, Modlin RL, Porcelli SA. CD1 c restricts responses of mycobacteria-specific T cells- evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J Immunol* 1996; 157: 2795-2803.
 9. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology* 1997; 1: 579-588.
 10. La Placa M. *Principi di microbiologia medica*. Società editrice Esculapio 2007; 247-257).
 11. Fatkenheuer G, Taelman H, Lepage P, Scwenk A, Wenzel R. The return of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34:139-146.
 12. Haas F, Haas SS. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness. In: Rom WN, Garay SM, eds. *Tuberculosis*, 1st edn. Boston MA: Little Brown and Company, 1996: 3-19.
 13. Donoghue HD, Spigelman M et al. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 584-92.).
 14. Bates JH, Stead WW. The history of tuberculosis as a global epidemic. *Med Clin North Am* 1993; 77: 1205-1217.
 15. Mc Kenna MT, Mc Cray E, Jones JL, Onorato IM, Castro KG. The fall after the rise: tuberculosis in the United States, 1991 through 1994. *Am J Public Health* 1998; 88: 1059-1063
 16. Hinshaw HC, Feldman WH, Pfuetze KH. Treatment of tuberculosis with streptomycin:

a summary of observations on one hundred cases. JAMA 1946; 132: 778–782.

17. Murray JF. A century of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 1181-1186.
18. Fatkenheuer G, Taelman H et al. The return of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999 ; 34 : 139-146.
19. WHO Report 2012, Global Tuberculosis Control
20. Matteo Zignol, Wayne van Gemert, Dennis Falzon et al.. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an update analysis, *Bull World Health Organ* 2012; 90:111–119D, doi:10.2471/BLT.11.092585,
21. WHO and Stop TB partnership, The Stop Tb Strategy, Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals, 2006.
22. European Centre for Disease Prevention and Control, Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, 2012.
23. M. Sprenger European Centre for Disease Prevention and Control Director, Stockholm, 2012, Urban tuberculosis control in the European Union, World Tuberculosis Day, Rotterdam, 23 March 2012.
24. M. Morandi, S. d’Amato et al. La Tuberculosis in Italia, Rapporto 2008, Istituto Superiore di Sanità, Ministero della Salute, Servizio Sanitario Regionale Emilia Romagna,
25. Epidemiologia della tubercolosi in Italia (1995-2007). Ufficio V - Malattie Infettive e Profilassi
Internazionale Dipartimento della Prevenzione e della Comunicazione – DG Prevenzione Sanitaria, Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.
26. L. R. Codecasa, Rapporto sulla Tuberculosis a Milano, Istituto Villa Marelli, Regione Lombardia – ASL Milano. 2012, Milano.
27. Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. Harrison, Principi di medicina interna, 14a edizione, Mc Graw Hill 1999. Parte 7, sezione 8:1157-1180.
28. Mandell, Douglas, Bennett. Principles and practice of infectious disease. Vol 2. Fifth edition, Churchill Livingstone.
29. Etkind S, Contact tracing. Tb: a comprehensive international approach. Lung biology in Health and disease. New York, NY: Marcel dekker, 1993:pp 257-289.
30. Robbins. Le basi patologiche delle malattie, vol. 1. Ed Piccin.

31. Surendra Kumar Sharma, Alladi Mohan, Anju Sharma, Dipendra Kumar Mitra, Miliary tuberculosis: new insights into an old disease, *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 415–30.
32. Peter Small et al. Management of tuberculosis in the United States. *New Engl Journ Med* 19 Luglio 2001.
33. Yıldırım A. Bayazıtı Nurhayat Bayazıtı Mustafa Namidurub, *Mycobacterial Cervical Lymphadenitis*, *ORL* 2004;66:275–280.
34. S.K. Sharma & A. Mohan, Extrapulmonary tuberculosis, Review Article, *Indian J Med Res* 120, October 2004, pp 316-353.
35. Marjorie P. Golden, M.D, Holenarasipur R. Vikram, M.D. Extrapulmonary Tuberculosis: An Overview, *American Family Physician*, November 1, 2005 - Volume 72, Number 9, pag. 1761–1767.
36. Gülgün Engin, MD, Bülent Acunas *Imaging of Extrapulmonary Tuberculosis*, *RadioGraphics* 2000; 20:471–488.
37. Peter R. Donald, M.D., and Johan F. Schoeman, M.D, *Tuberculous Meningitis*,, *n engl j*, october 21, 2004; *med* 351;17.
38. Kennedy DH, Fallon RJ. Tuberculous meningitis. *JAMA* 1979; 241: 264-268.
39. Haas DW. Current and future application of polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 311-313.
40. Taylor GR, Dannecker GE, Hoppe JE et al. Negative polymerase chain reaction in a child with tuberculous meningoencephalitis. *Infection* 1997; 25: 256-257.
41. Teruyuki Takahashi, Masato Tamura and Toshiaki Takasu, *The PCR-Based Diagnosis of Central Nervous System, Tuberculosis: Up to Date, Tuberculosis Research and Treatment*, Volume 2012, Article ID 831292, 17.
42. Jos´e M. Pereira, Antonio J. Madureira, Alberto Vieira, Isabel Ramos; *Abdominal tuberculosis: Imaging features*, *European Journal of Radiology* 55 (2005) 173–180.
43. Fernandez CM, Arguelles BS, Ledo L et al. Ascites adenosine deaminase activity is decreased in tuberculous ascites with low protein content. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 1500-1503.
44. Gorse GJ, Belshe RB. Male genital tuberculosis. A review of the literature with instructive case reports. *Rev Infect Dis* 1985; 71: 5-6.
45. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003; 35: 1407-1412.
46. Su WJ. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35: 209-214.
47. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2321–2325.

48. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 2007; 11:1–196.
49. David A.J. Moore, M.D., Carlton A.W. Evans, et al.; Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB, *N Engl J Med*. 2006 October 12; 355(15): 1539–1550.
50. Anandi Martin et al.; Thin Layer Agar, Microcolony Detection, Procedure Manual, 04-2009.
51. Davies AP, Newport LE, Billington OJ, Gillespie SH. Length of time to laboratory diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection: comparison of in-house methods with reference laboratory results. *Journal of Infection* 1999; 39: 205-208.
52. Cho SN, Brennan PJ. Tuberculosis : diagnostics. *Tuberculosis* 2007; 87: 514-517.
53. Cho SN. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. *Yonsei Med J* 2007; 48: 347-359.
54. Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 418-428.
55. Tiwari RP, Hattikudur NS, Bharmal RN et al. Modern approaches to a rapid diagnosis of tuberculosis: promises and challenges ahead. *Tuberculosis* 2007; 87: 193-201.
56. Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D et al. Diagnosis of tuberculosis; available technologies, limitations and possibilities. *Journal of Clinical Laboratory analysis* 2003; 17: 155-163.
57. Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification-based clinical diagnostic techniques. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2003; 35: 1407-1412.
58. Melissa R. Nyendak, Deborah A. Lewinsohn and David M. Lewinsohn. New diagnostic methods for tuberculosis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2009, 22:174–182.
59. Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, Ang CF, Folas RA, Mendoza MT, et al. MPB 64 mycobacterial antigen: a new skin test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. *Int J Tuber Lung Dis* 1998; 2: 541-6.
60. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, Westh H, Mathiesen LR, Ravn P. Latent Tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the M. Tuberculosis Specific Interferon Gamma test. *Respir Res* 2006; 7(1):56.
61. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, et al. Direct ex vivo analysis of antigen specific IFN γ secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 2001; 167 :5217-5225.
62. Lalvani A, Nagvenkar P, Udwardia Z, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent Mycobacterium tuberculosis infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001; 183: 469-477.
63. Chee CB, Khinmar KW, Gan SH, et al. Latent tuberculosis infection treatment and T-cell

- responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175: 282-287.
64. Ewer K, Millington KA, Deeks JJ, et al. Dynamic antigen specific T-cell responses after point- source exposure to Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 831-839.
65. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, et al. Dynamic relationship between IFN γ and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 2007.
66. Jafari C, Lange C. Sutton's law: local immunodiagnosis of tuberculosis. *Infection* 2008; 36: 510-514.
67. Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century. *Chest* 2007; 131: 1898-1906.
68. Kang YA, Lee HW et al. Usefulness of whole blood interferon γ assay and interferon γ enzyme linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest* 2007; 132: 959-965.
69. Center for Diseases Control, guidelines for TB treatment, Atlanta, 2012.
70. Salmaan Keshavjee, Paul E. Farmer, Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern Medicine, *N Engl J Med* 2012; 367:931-936, September 6, 2012.
71. WHO, Treatment of tuberculosis, Guidelines, Forth Edition, 2010.
72. Maartens G, Wilkinson R. Tuberculosis. *Lancet* 2007; 370: 2030-2043.
73. Schaberg T, Rebhan K, Lode H. et al. Risk factors for side-effects of isoniazid, rifampin and pyrazinamide in patients hospitalized for pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 1996; 9:2026 – 2030.
74. Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Lai SL, Yang SY et al. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology* 2002; 35(4):883 – 889.
75. Alma Tostmann, Martin J Boeree, Rob E Aarnoutse, Wiel C M de Lange et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity, Concise up-to-date review, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23 (2008) 192–202 © 2007.
76. Fernandez-Villar A, Sopena B, Fernandez-Villar J, Vazquez-Gallardo R, Ulloa F, Leiro V et al. The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8(12):1499 –1505.
77. Ormerod LP, Horsfield N. Frequency and type of reactions to antituberculosis drugs: observations in routine treatment. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77:37 – 42.
78. Veen J, Raviglione M, Rieder HL, Migliori GB, Graf P, Grzemska M et al. Standardized tuberculosis treatment outcome monitoring in Europe. Recommendations of a Working Group of the World Health Organization (WHO) and the European Region of the International Union

Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) for uniform reporting by cohort analysis of treatment outcome in tuberculosis patients. *Eur Respir J* 1998;12(2):505 – 510.

79. Dooley S.W., Jarvis W.R., Martone W.J., Snider D.E.Jr. Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann. Intern. Med.* 1992; 117: 257-8.
80. Fattorini L, Migliori GB, Cassone A. Extensively drug – resistant (XDR) tuberculosis: an old and new threat. *Ann Ist Super Sanità* 2007; 43: 317-319.
81. Gandhi NR, Moll A, Pawinski R, et al. High prevalence and mortality from extensively-drug resistant (XDR) TB in TB/HIV coinfecting patients in rural South Africa. XVI International AIDS Conference; Toronto, Canada; Aug 13–18, 2006. Abstract THLB0210.
82. Ormerod LP. Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB): epidemiology, prevention and treatment. *British Medical Bulletin* 2007; 73 and 74: 17-24.
83. Jassal M, Bishai WR. Extensively drug resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 19-30.
84. Burman WJ, Jones BE. Treatment of HIV-related tuberculosis in the ERA of the effective antiretroviral Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:7-12.
85. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. November 3, 2008; 1-139.
86. De Jong CB, Isreleski DM, Corbett EL, Small PM. Clinical management of tuberculosis in the context of HIV infection. *Annu. Rev. Med.* 2004 ; 55 : 283-301.
87. Burman WJ, Jones BE. Treatment of HIV-related tuberculosis in the ERA of the effective antiretroviral Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:7-12.
88. Blumberg HM, Byrman WJ, Chaisson Re et al. Am Thoracic Society/Centers for diseases control and prevention/infectious diseases society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:603-62.
89. Smieja MJ, Marchetti CA, Cook DJ, Smaill FM. Isoniazid for preventing tuberculosis in non- HIV infected Persons (Cochrane review). Issue 4. 1999. Oxford, The Cochrane Library.
90. Blumberg HM, Leonard MK, Jr., Jasmer RM. Update on the treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. *JAMA* 2005; 293(22):2776 – 2784.
91. Nolan CM. Isoniazid for latent tuberculosis infection: approaching 40 and reaching its prime. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168(4):412 – 413.
92. Woldehanna S, Volmink J. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (1):CD000171.
93. Orme IM, Collins FM. Efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in mice undergoing prior pulmonary infection with atypical mycobacteria. *Infect Immun* 1984; 44: 28-32.
94. Fine PE. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis* 1989; 11(Suppl 2): S353-S359.

95. Mokrousov I. Genetic geography of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multifacet mirror of human history. *Infection, Genetics and Evolution* 2008; 8: 777-785.
96. Bannon BJ. BCG and tuberculosis. *Arch Dis Child* 1999; 80: 80-83.
97. Haile M, Kallenius G. Recent development in tuberculosis vaccines. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2005; 18: 211-215.
98. van Embden Jan D.A., Cave M. Donald, Crawford Jack T., Dale Jeremy W., Eisenach Kathleen D., Gicquel Brigitte, Hermans Peter, Martin Carlos, McAdam Ruth, Shinnick Thomas M., and Small Peter M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology*. Feb. 1993, p. 406-409
99. Mazurek G.H., M.D. Cave, K.D. Eisenach, R.J. Wallace, J.H. Bates, J.T. Crawford. Chromosomal DNA Fingerprint Patterns Produced with IS6110 as Strain-Specific Markers for Epidemiologic Study of Tuberculosis. *J. Clin. Micr.* 1991 ; 2030-2033.
100. van Soolingen D., Hermans P.W.M., de Haas P.E.W., Soll D.R., van Embden J.D.A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2578-86.
101. Maslow Joel N., Mulligan Maury Ellis, and Arbeit Robert D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infections Diseases*, 1993; 17: 153-64.
102. Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D.A., Young D.B., and Shaw R.J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Spoligotyping and IS 6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 647-651.
103. Mazurec GH, Cave MD, Crawford JD et al. Chromosomal DNA Fingerprint Patterns Produced with IS6110 as Strain-Specific Markers for Epidemiologic Study of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29: 2030-2033.
104. Van Soolingen D, Hermans PW, Van Embden J et al. Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29: 2578-2586.
105. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN.,Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights, *Clin Microbiol Rev.* 2006 Oct;19(4):658-85.).
106. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite- like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36:762-71
107. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3536-71).

108. Barners PF, Cave Donald M. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 1149-1156.
109. Hawkey PM, Smith EG, Evans JT et al. Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3514-20).
110. Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiology markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18).
111. Sola C, Filliol I, Legrand E, Rastogi N et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 2003; 125-133
112. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Supply P et al. Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive- Unit-Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 691-697
113. Hanekom M, Victor TC, Warren RM et al. Discordance between Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable- Number Tandem-Repeat Typing and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Genotyping for Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in a Setting of High Incidence of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3338-3345).
114. Andreas Roetzer, et al. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* Typing Methods in a 4-Year Study in Schleswig-Holstein, Northern Germany, *J Clin Microbiol*. 2011 December; 49(12): 4173-4178
115. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 302-5.
116. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1165-70.
117. Zhang M, Gong J-H, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis* 1999;179:1213-7.
118. Osservatorio Regionale per l'integrazione e la multi etnicità, Rapporto sull'immigrazione nella provincia di Milano, anno 2010.
119. Caritas / Migrantes, Dossier Statistico sull'Immigrazione, 21° Rapporto, 2011.
120. ISTAT, La popolazione Straniera Residente in Italia, 01/01/2011.
121. G.C. Blangiardo, "La presenza straniera in Italia: dal quadro di riferimento agli scenari evolutivi", Quindicesimo Rapporto sulle Migrazioni 2009, FrancoAngeli, Milano, 2009.

122. Carlo Garzelli, Laura Rindi. Molecular epidemiological approaches to study epidemiology of tuberculosis in low-incidence settings receiving immigrants. *Infection, Genetics and Evolutions* (2011).
123. de Jong BC, et al., Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by *Mycobacterium tuberculosis* lineage in The Gambia. *J Infect Dis*. 2008 Oct 1;198(7):1037-43.
124. Van der Spuy GD, Warren RM, van Helden PD. The role of molecular epidemiology in low-income, high-burden countries. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009 Apr;13(4):419-20.
125. Brudey et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology, *BMC Microbiol* 2006 Mar 6;6 (1) : 23.
126. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 302-5.
127. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1165-70.
128. Zhang M, Gong J-H, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis* 1999;179:1213-7.
129. Filliol I, Driscoll JR, et al., Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study, *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):1963-70).
130. Groenen PM, et al., Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol*. 1993 Dec;10(5):1057-65).
131. Warren RM, Streicher EM, Sampson SL, van der Spuy GD, Richardson M, Nguyen D, Behr MA, Victor TC, van Helden PD., Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data., *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4457-65
132. Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping., Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, Ushewokunze S, Zizhou S, Marshall BG, Makombe R, Van Embden JD, Mason PR, Shaw RJ, *Thorax*. 1998 May;53(5):346-50).
133. Kamberbeek J, Schou L, Kolk A, Van Embden et al. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35: 907-914.
134. Olivier Neyrolles¹, Lluís Quintana-Murci, Sexual Inequality in Tuberculosis, *Plos Medicine*, December 2009, Volume 6, Issue 12, e1000199.
135. N. Lari, L. Rindi, et al., Three-Year Longitudinal Study of Genotypes of *Mycobacterium*

tuberculosis Isolates in Tuscany, Italy, *Journal Of Clinical Microbiology*, June 2007, p. 1851–1857.

136. Xinyu Zhang , Aase B. Andersen , Troels Lillebaek , Zaza Kamper-Jørgensen , Vibeke Østergaard Thomsen , Karin Ladefoged , Carl F. Marrs , Lixin Zhang , and Zhenhua Yang Effect of Sex, Age, and Race on the Clinical Presentation of Tuberculosis: A 15-Year Population-Based Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 85(2), 2011, pp. 285–290

137. J. N. Lin, C. H. Lai, Y. H. Chen, S. S. J. Lee, S. S. Tsai, C. K. Huang, H. C. Chung, S. H. Liang, H. H. Lin. Risk factors for extra-pulmonary tuberculosis compared to pulmonary tuberculosis. *INT J TUBERC LUNG DIS* 13(5):620–625.

138. Eleanor S. Click, Patrick K. Moonan, Carla A. Winston, Lauren S. Cowan, and John E. Oeltmann. Relationship Between Mycobacterium tuberculosis Phylogenetic Lineage and Clinical Site of Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* 2012;54(2):211–9.