



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Scienze Biomediche

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Indirizzo: Microbiologia ed Immunologia

XXVIII Ciclo

Direttore Prof. Leonardo Antonio Sechi

**Confronto di metodologie per l'identificazione
della Tuberculosis latente e attiva**

Tutor:
Prof.ssa Stefania Zanetti

Dottoranda:
Dott.ssa Marina Cubeddu

Anno Accademico 2014/2015

Indice

Introduzione	pag. 3
Scopo della tesi	pag. 43
Materiali e metodi	pag. 46
Risultati	pag. 52
Discussione	pag. 68
Bibliografia	pag. 74

Abstract

Tuberculosis (TB), together with HIV and Malaria, represents one of the three infectious diseases world-wide. The World Health Organization (WHO) estimated that one third of the world's population is infected with *Mtb*. Only 10%, of the exposed individuals, will develop active tuberculosis disease within 2 years post-exposure, while the remaining 90% of infected subjects contain infection for the duration of their lifetime. Existing diagnostic tools and therapeutic interventions for TB are suboptimal. Thus, new vaccines, immunotherapeutic interventions and new diagnostic tools, that are able to discriminate individuals with LTBI from those with active TB disease, are required to facilitate TB control efforts. The Tuberculin skin test (TST) is one of the few tests that have been used for about 100 years for the diagnosis of *Mtb* infection. However, the TST also has limitations such as: the reduced sensitivity and specificity and the inability to distinguish latently infected individuals from patients with active TB. Due to the limitations of TST, new in- vitro assays have been developed. These assays measure interferon- γ (IFN- γ) production upon *Mtb* specific antigen stimulation (IGRAs) and they are more sensitive and specific than TST. However, these assays do not discriminate between active TB and LTBI. Therefore, a possible contribution to discriminate these different TB stages could be envisaged in a more accurate definition of the immunological response of *Mtb* infection to understand which components of the host immune response or which tubercular antigens could be used to discriminate between two infection stages. It is very important as it could allow to develop new diagnostic tools, resulting in greater control of TB.

Epidemiologia

A distanza di oltre 120 anni dalla scoperta di *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e nonostante i progressi compiuti in ambito patogenetico e terapeutico, la tubercolosi (TB) ancora oggi rappresenta la principale causa di morte da singolo agente infettivo seconda sola all'infezione da HIV. Nonostante sia una malattia prevenibile e nella maggioranza dei casi curabile, la TB costituisce oggi una delle emergenze sanitarie più drammatiche, tanto da essere stata dichiarata nel 1993 dalla World Health Organization (WHO) un'emergenza globale per l'enorme carico sanitario, economico e sociale che l'accompagna. Tutte le più aggiornate informazioni relative allo stato epidemiologico mondiale dell'infezione tubercolare sono presenti all'interno del WHO report 2014 - Global Tuberculosis che raccoglie i dati provenienti da 202 stati e regioni. Secondo tale rapporto, nel 2013 sono stati stimati circa 9 milioni di nuovi casi di TB (126/100.000 abitanti per anno) e 1.5 milioni di morti (1.1 milioni in soggetti HIV negativi e 500.000 mila in individui HIV positivi). Le aree geografiche particolarmente colpite sono quelle dei paesi in via di sviluppo come Asia (56%) e Africa (29%), ma anche, seppure in minor proporzione, la Regione Orientale del Mediterraneo (8%), la Regione Europea (4%) e la Regione delle Americhe (3%) (Figura 1). I 6 stati con il più alto numero di casi di tubercolosi sono l'India (2.0-2.5 milioni), la Cina (0.9-1.1 milioni), la Nigeria (340.000-880.000), il Pakistan (370.000-650.000), l'Indonesia e il Sud Africa (410.000-520.000). India e Cina hanno segnalato, rispettivamente, il 24% e l'11% dei casi totali. Sono stati identificati 22 Paesi ad elevata incidenza (High-Burden Countries) che da soli aggregano l'80% dei casi di tutto il mondo.

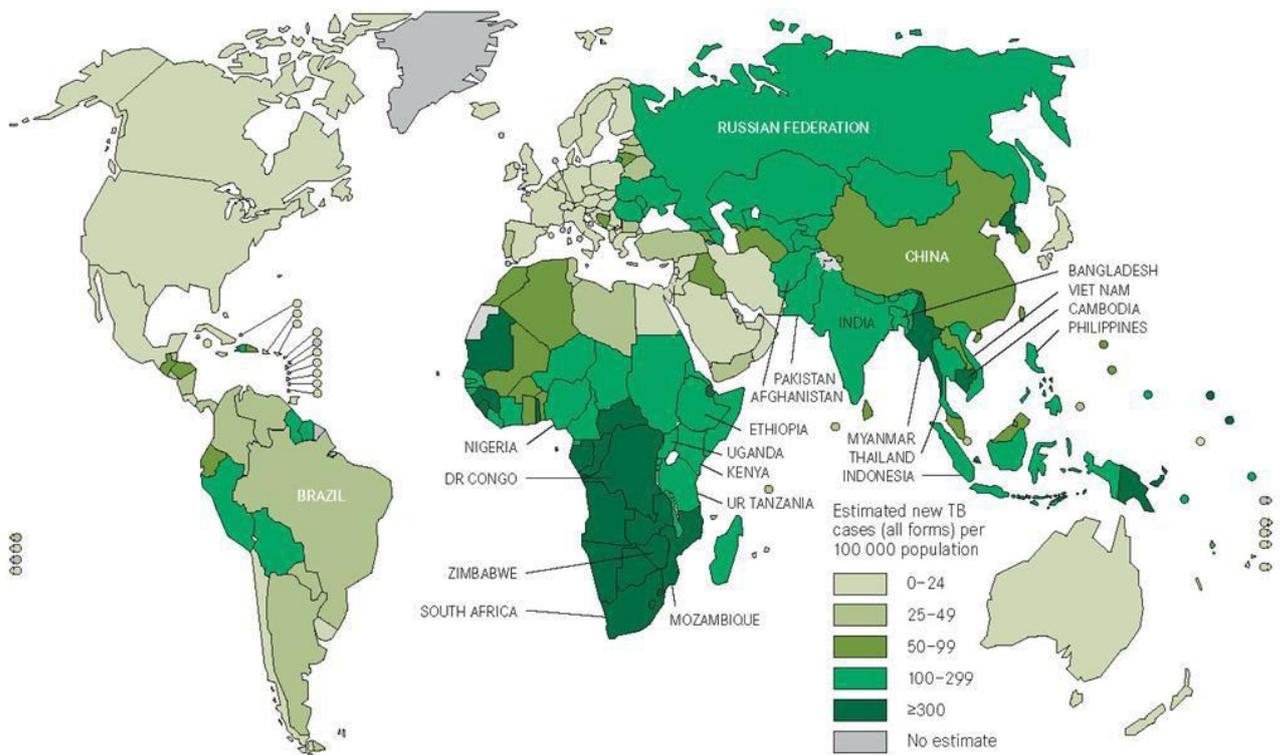


Figura 1. Tassi di incidenza globali di tubercolosi stimati dalla WHO, 2013.

Per cercare di ridurre l'incidenza della malattia nel mondo, la WHO ha sviluppato la *Stop TB Strategy* (Raviglione M, 2006). L'obiettivo di questa strategia è quello di dimezzare entro il 2015 i tassi di incidenza, mortalità e prevalenza rispetto ai livelli del 1990. Tale obiettivo è stato raggiunto in tutte le 6 Regioni WHO e nella maggior parte dei HBCs. Infatti, globalmente, l'incidenza della TB è diminuita dell'1.5% per anno tra il 2000 e il 2013 e dello 0.6% tra il 2012 e 2013 mentre la mortalità e la prevalenza tra il 1990 e il 2013 sono diminuite, rispettivamente, del 45% e del 41%. Solo due delle 6 Regioni WHO hanno raggiunto tutti i tre obiettivi per il 2015: la Regione delle Americhe e la Regione del Pacifico occidentale. 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 molti stati africani, che non possiedono adeguati programmi di sorveglianza. Per tubercolosi *multi*

drug-resistant (MDR) si intende la tubercolosi provocata da ceppi di *Mtb* resistenti a Isoniazide e Rifampicina ritenuti i capisaldi della terapia. In alcuni casi, la MDR-TB può trasformarsi in una forma di infezione ancora più difficile da trattare, in quanto resistente a tutti i fluorochinoloni e ad almeno tre farmaci di seconda linea come capreomicina, kanamicina e amikacina, definita *extensively drug-resistant tuberculosis* (XDR-TB). Nel 2013, sono stati stimati 480.000 nuovi casi MDR e approssimativamente 210.000 morti 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. Globalmente fra i ceppi di tubercolosi MDR, la percentuale di ceppi XDR è del 9.4% (Matteo Zignol, Wayneven G et al., 2012). La prevalenza di MDR-TB ed un suo eventuale sviluppo in XDR-TB rappresenta un fallimento delle politiche passate, pertanto gli sforzi devono essere incrementati in modo sostanziale e sostenuti da un forte impegno politico se si vuole che abbiano un effetto sulla crescente epidemia di tubercolosi farmaco resistente (Wright A, et al., 2009). Il quadro epidemiologico dei Paesi membri della Regione Europea è presente nel documento congiunto Ecdc e WHO Europe "Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe" pubblicato nel 2014. Secondo tale documento l'incidenza dei casi di TB notificati nel 2012 continua a mostrare un trend in diminuzione rispetto agli anni precedenti. Le uniche eccezioni sono Cipro, Islanda, Malta, Norvegia, Svezia e Regno Unito (tutti Paesi a bassa incidenza con un'elevata proporzione di casi tra persone di origine straniera) dove i tassi di incidenza rimangono stabili o sono in aumento. Nel 2012, nei 53 Paesi membri della Regione Europea sono stati stimati 353 mila nuovi casi di TB (39,4/100.000 abitanti), che rappresentano il 4% del totale registrato nel mondo. L'85% dei casi incidenti si sono verificati nei 18 Paesi ad alta priorità. Come si può vedere dalla figura 2, l'incidenza è molto più alta nei paesi orientali rispetto a quelli occidentali

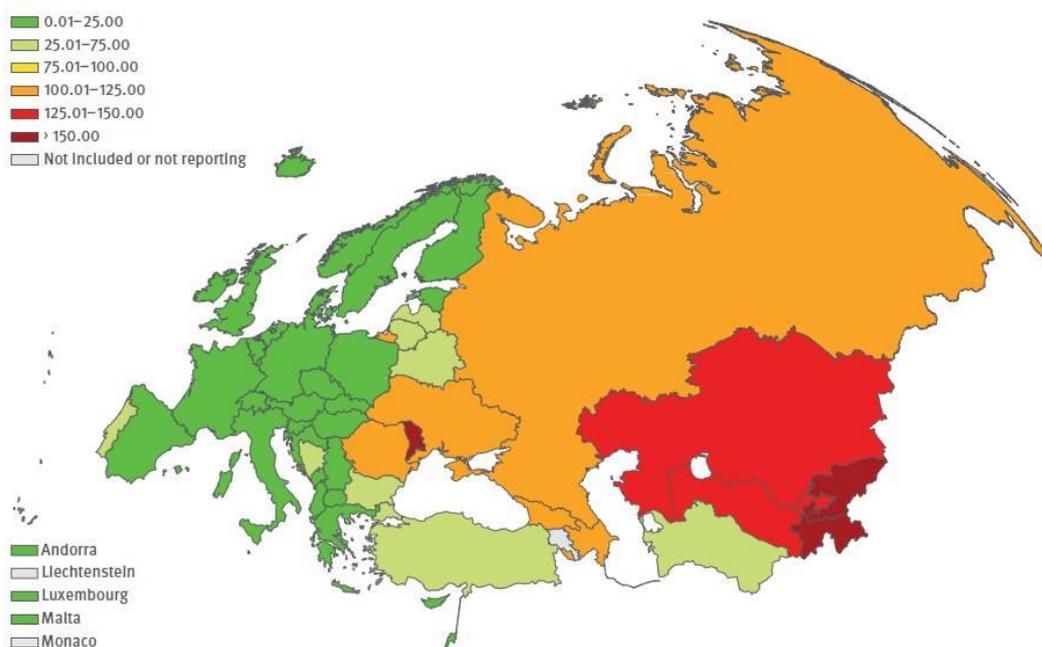


Figura 2. Tassi di incidenza di tubercolosi in Europa stimati dalla WHO, 2013.

Come risposta al problema della multi resistenza, i 53 Paesi hanno aderito al piano di azione della Regione Europea. Dal momento che la grande maggioranza dei casi si verifica nei Paesi ad alta priorità, è qui che devono essere focalizzati gli sforzi maggiori per combattere la TB nella Regione. Tuttavia, la situazione richiede attenzione anche nei paesi dell'Europa Occidentale, soprattutto nelle grandi città. Infine è preoccupante notare che vari Paesi non inviano dati sulla suscettibilità ai farmaci, sull'outcome del trattamento e sullo stato HIV. La raccolta di questi dati è fondamentale per indirizzare i programmi di controllo della malattia. I dati per l'Italia provengono dal sistema di notifica dei casi di tubercolosi del Ministero della Salute e costituiscono il flusso informativo ufficiale, cui si fa riferimento per il monitoraggio dell'andamento della malattia in Italia. L'attuale situazione epidemiologica della tubercolosi in Italia è caratterizzata da una bassa incidenza nella popolazione generale, dalla concentrazione della maggior parte dei casi in alcuni gruppi a rischio e in alcune classi di età, e dall'emergere di ceppi tubercolari multi-resistenti. L'ultimo rapporto pubblicato è "La Tubercolosi in Italia – anno 2008", nato dalla collaborazione tra il Ministero della

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

6

Salute, Istituto Superiore di Sanità e Agenzia Sanitaria e Sociale dell'Emilia-Romagna (Morandi M., D'Amato S., Suligoi B. et al., 2008). Nel decennio 1999-2008 i tassi d'incidenza di tubercolosi sono stati stabili e inferiori ai 10 casi per 100.000 abitanti, valore che pone l'Italia tra i Paesi a bassa endemia. Tuttavia, 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 la differenza a livello territoriale delle caratteristiche della popolazione suscettibile. Nel 2008 sono stati notificati 4.418 casi di TB in 19 Regioni e 2 Province Autonome (Bolzano e Trento), con una diminuzione del 2.4% dei casi rispetto al 2007 (4.527). Questi dati confermano l'andamento in discesa osservabile dal 1995; infatti tra il 1995 e il 2007 l'incidenza della TB ha registrato un decremento pari al 19%, passando da 10 casi/100.000 abitanti (1995) a 7.7 casi/100.000 abitanti (2007). Rispetto alla media decennale, le regioni del Nord nel 2008 hanno notificato un maggior numero di casi di tubercolosi: il 73% dei casi totali notificati provengono da Lombardia, Lazio, Veneto, Emilia-Romagna e Piemonte. Al contrario, le Regioni del Centro, del Sud e delle Isole evidenziano un trend in diminuzione; il Sud e le Isole hanno notificato solo il 10% dei casi totali a livello nazionale. Dati italiani (provvisori) più recenti sono disponibili nel Global Tuberculosis report 2014 del WHO (dati 2013). Da tali dati si evince che il numero annuale dei casi di TB è diminuito ulteriormente passando da 4.418 (2008) a 3.153 (2013), che corrisponde ad una incidenza pari a 5.2 casi per 100.000 abitanti. L'associazione fra il virus dell'HIV ed *Mtb* ha determinato un incremento nell'incidenza della tubercolosi in quasi tutti i paesi del mondo, assumendo dimensioni pandemiche nel continente africano, con tassi di incidenza di 1000 per 100.000 abitanti in Sud Africa, e 100-1000 nelle regioni dell'Africa centrale. Dal momento che la TB è una malattia della povertà, è facile capire gli elevati tassi di incidenza nei paesi in via di sviluppo dove la povertà è molto diffusa. Nei Paesi industrializzati il riemergere della malattia è dovuto a diversi fattori quali la diffusione dell'HIV, la comparsa di ceppi *Mtb* farmaco-resistenti, i flussi migratori di soggetti provenienti da aree dove la TB è endemica nonché l'abbandono delle misure di controllo e di prevenzione che avevano contribuito a ridurre i casi di tubercolosi nella seconda metà del secolo scorso. L'insorgenza di ceppi resistenti ai farmaci è un altro

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

problema associato alla diffusione della TB, derivante da una non corretta adesione da parte del paziente ai protocolli terapeutici prescritti. Secondo i dati riportati dalla WHO, la MDR-TB è oramai presente in tutte le aree del pianeta e data la scarsa disponibilità di farmaci ad azione antitubercolare alternativi, si può ben comprendere come tale forma di tubercolosi costituisca uno dei problemi più importanti nel controllo e trattamento della TB. Dal momento che il trattamento terapeutico è molto lungo, con una durata di 6 mesi, può accadere che i soggetti affetti da malattia attiva non assumano i farmaci per tutto il periodo necessario alla guarigione e in modo corretto, rappresentando, pertanto, un rischio a seguito del rilascio di microrganismi divenuti resistenti ai farmaci. Al fine di poter garantire l'osservanza della durata del trattamento terapeutico e la conseguente assunzione dei farmaci, la WHO ha stabilito che per ogni paziente venga effettuata una "Direct Observed Therapy" (DOT) (Moher D., 1999). In base a questa strategia, un assistente deve supervisionare direttamente l'assunzione del farmaco da parte del paziente. Benché questa strategia sia stata adottata in tutto il mondo, non sempre viene applicata correttamente, infatti solo 1 paziente su 5 riceve la DOT. La necessità di diffondere il trattamento è quella di prevenire il contagio: ogni persona affetta da tubercolosi polmonare attiva, se non curata, infetta dalle 10 alle 15 persone l'anno. Per potenziare il programma della DOT, nel 2001, la WHO ha messo in campo una nuova strategia andando a porre maggior attenzione ai casi di co-infezione HIV-TB e di multi-resistenza ai farmaci. Non solo, il terzo punto di questo programma prevede il potenziamento dei sistemi sanitari siano essi pubblici che privati in modo da raggiungere il maggior numero possibile di malati, e assicurare che venga fornita loro la migliore assistenza possibile. Una maggiore sensibilizzazione verso la popolazione sia sana che malata al fine di renderla consapevole della malattia ed un potenziamento nel campo della ricerca sono gli ultimi due punti del programma di questo progetto. Il problema dell'acquisizione della resistenza ai farmaci dei ceppi micobatterici è complicata dall'associazione di *Mtb* con il virus dell'HIV (Draper P., 1998). L'HIV ha profondamente modificato l'epidemiologia della tubercolosi aumentando considerevolmente la sua morbilità e mortalità (Fätkenheuer G., 1999). La relazione fra i due patogeni è molto complessa. Studi fatti indicano che l'infezione da HIV è

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

responsabile dell'incremento dei tassi di tubercolosi attiva, vista la capacità del virus dell'HIV di attaccare i linfociti T CD4, coinvolti nella difesa contro la tubercolosi. Infatti, mentre una persona immunocompetente infettata con *Mtb* ha un rischio di sviluppare la malattia attiva del 5% nel corso della vita, negli individui con infezione da HIV questo rischio è del 7-10% per anno.

Mycobacterium tuberculosis

L'agente eziologico della tubercolosi è il *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), un patogeno intracellulare a crescita lenta, privo di flagello, asporigeno, aerobio-obbligato. Al microscopio *Mtb* si presenta con la classica forma bastoncellare, curva o leggermente piegata, di lunghezza media tra 2-4 μm e di larghezza tra 0.2-0.5 μm (Figura 3).

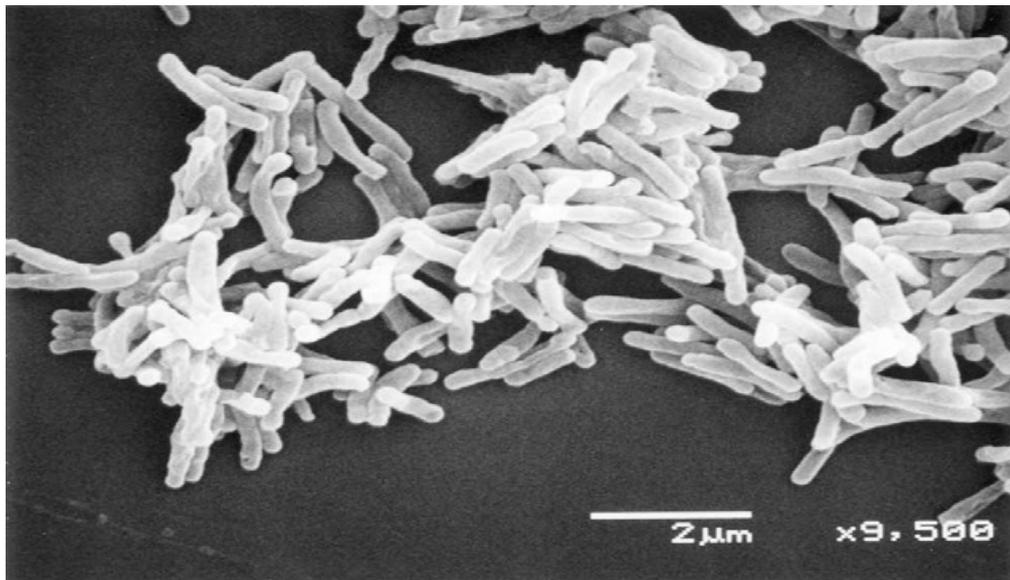


Figura 3. *Mycobacterium tuberculosis*.

Mtb stabilisce la sua infezione principalmente nel tessuto polmonare, con particolare predilezione per i lobi superiori in quanto ricchi di ossigeno. Il tempo di replicazione è intorno alle 24 h, sia in terreno di coltura che in vivo (Cole et al., 1998). La crescita batterica in laboratorio necessita dalle 3 alle 4 settimane per diventare visibile e porta alla formazione di colonie visibili, dalla superficie umida e frastagliata (Figura 4).



Figura 4. Colonie di *M. tuberculosis* su terreno.

Da un punto di vista tassonomico, *M. tuberculosis* appartiene all'ordine *Actinomycetales*, alla famiglia delle *Mycobacteriaceae* e al genere *Mycobacterium* (tabella 1).

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

Tabella 1. Classificazione tassonomica di *Mycobacterium tuberculosis*.

Ad oggi le specie individuate all'interno del genere *Mycobacterium* sono circa 150, ma il numero è in continuo aumento. Il genere *Mycobacterium* è raggruppato in complessi (*complex*) costituiti dalle specie simili fra loro dal punto di vista biologico e clinico per il tipo di patologia causata. *Mtb* appartiene al *Mycobacterium tuberculosis complex* che comprende altre specie patogene per l'uomo e per gli animali: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae* e *M. canettii*. *Mtb* è caratterizzato da acido-alcol resistenza evidenziabile mediante la colorazione di Ziehl-Nielsen, inoltre è molto resistente agli agenti chimici e fisici, mostrando una sensibilità media al calore e una lunga resistenza all'essiccamento (Ducati et al., 2006). *M. tuberculosis* presenta un rivestimento cellulare di protezione estremamente complesso costituito da un insieme di lipidi, glicolipidi e proteine; tale rivestimento è formato da una membrana fosfolipidica rivestita all'esterno da una complessa parete cellulare. Nella parete, osservata al microscopio elettronico, sono distinguibili tre strati: uno più interno che è il peptidoglicano, uno intermedio che è l'arabinogalattano-micolato, e uno più esterno caratterizzato dalle catene idrocarburiche polari di acidi grassi e dall'estremità terminale del lipopolisaccaride lipoarabinomannano (LAM) (Brennan and Draper, 1994). Il peptidoglicano conferisce resistenza e rigidità alla parete batterica ed è il principale fattore di virulenza di *Mtb*. L'arabinogalattano è legato al peptidoglicano attraverso legami fosfodiesteri ed è esterificato alle estremità distali con acidi grassi ad alto peso molecolare (acido micolico). L'acido micolico costituisce una barriera altamente idrofobica responsabile dell'alta resistenza di *Mtb* ad alcuni farmaci. Associati all'arabinogalattano-micolato ci sono una vasta gamma di lipidi e glicolipidi tra cui il LAM, il lipomannano (LM) e il fosfatidil inositolo mannosio (figura 5).

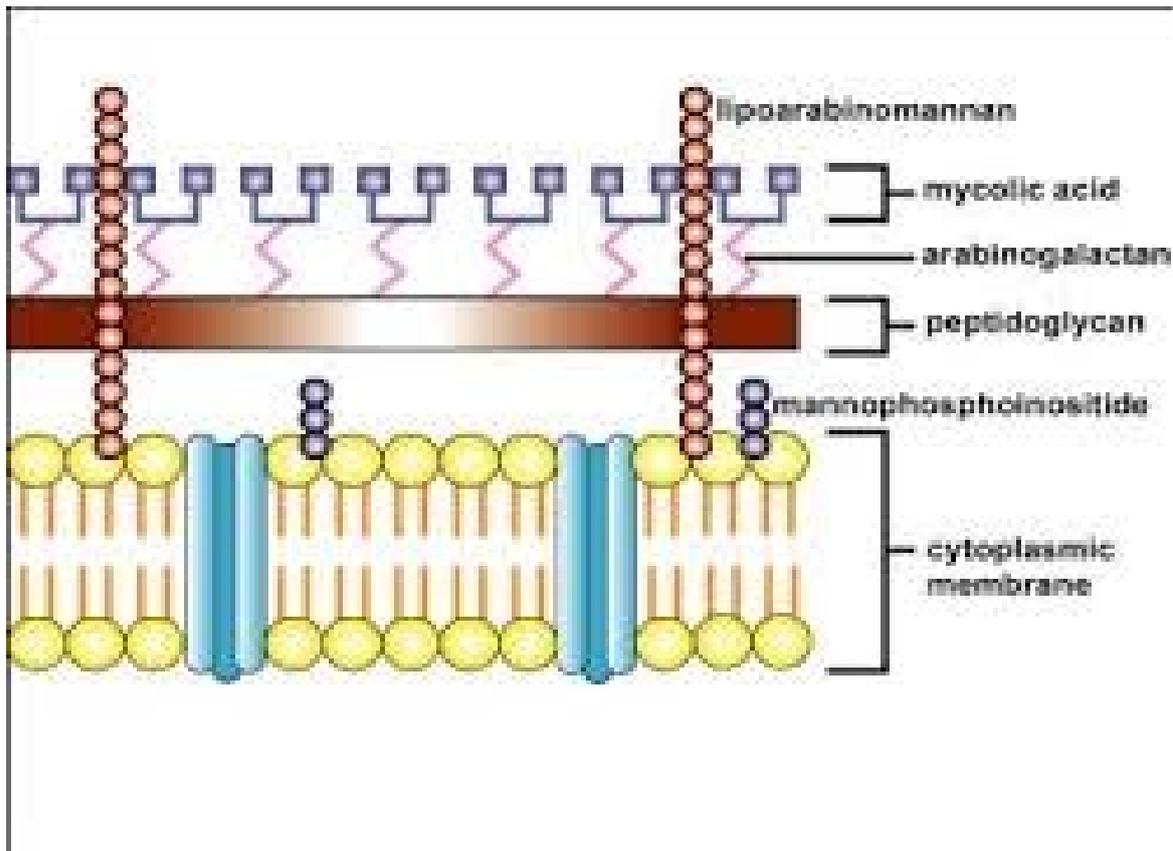


Figura 5. Struttura della parete di *M. tuberculosis*.

Un componente della parete cellulare che determina virulenza è il fattore cordale (trealosio 6,6-dimicolato), glicolipide associato all'acido micolico, implicato nell'attivazione di eventi mediati da citochine. Il fattore cordale induce tossicità sistemica, rilascio da parte dei macrofagi di chemochine ed ha una spiccata capacità di indurre la formazione di granulomi (Roland et al., 2001). Inoltre è nota la sua capacità di inibire la fusione tra le vescicole fosfolipidiche indotta dal calcio, la migrazione dei leucociti, e la formazione del fagolisosoma (Spargo et al., 1991). Un'azione analoga è svolta da altri importanti elementi della parete, i solfatidi, glicolipidi di superficie che, all'interno delle cellule macrofagiche, inibiscono la fusione del fagosoma con i lisosomi. Rilevante è inoltre il ruolo della lipoproteina 19 kDa, molecola che si trova ancorata alla membrana attraverso la sua porzione lipidica idrofoba. Essa sembra essere implicata in una vasta gamma di risposte immunologiche come l'induzione di IL-

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

13

12 da parte dei macrofagi umani e l'incremento, a livello trascrizionale, della iNOS (ossido nitrico sintasi inducibile) (Brightbill et al., 1999). La lipoproteina 19 kDa è in grado di riconoscere e legarsi ad un recettore appartenente alla famiglia dei recettori di tipo Toll (Toll-like receptors, TLR), il TLR-2, inducendo l'apoptosi di cellule monocitiche e la produzione di citochine proinfiammatorie (Ciaramella et al., 2000). Infine un altro componente rilevante della parete micobatterica è il lipoarabinomannano (LAM). Il LAM micobatterico è riconosciuto da un membro della famiglia dei recettori di tipo Toll, il TLR4, che in seguito a tale legame induce segnali d'attivazione nel macrofago, rilevabili in termini di produzione di citochine proinfiammatorie nel microambiente circostante (Aderem et al., 2000). Il LAM svolge anche una serie di funzioni immunoregolatorie finalizzate alla sopravvivenza intracellulare del micobatterio stesso, tra le quali: l'inattivazione degli intermedi reattivi dell'ossigeno, l'inibizione dell'attivazione delle fosfolipasi D macrofagiche implicate nella maturazione del fagolisosoma (Locati et al., 2001), l'inibizione dell'attività della proteina chinasi C (Schorey et al., 2003) e l'inibizione della maturazione del fagolisosoma (Fratti et al., 2003).

Patogenesi

La tubercolosi è una malattia che si trasmette per via aerea, a seguito dell'inalazione di goccioline di saliva, dette *droplet nuclei* (5-10 μm di diametro), immesse nell'ambiente attraverso la tosse, gli starnuti e la fonazione da un paziente affetto da tubercolosi polmonare bacillifera. Sebbene si possa potenzialmente manifestare in qualsiasi distretto dell'organismo, il polmone rappresenta sia la principale porta di entrata del microrganismo, sia un'importante sede di manifestazione della malattia. La tubercolosi extra-polmonare si sviluppa in meno del 10% dei casi. Lo sviluppo e l'evoluzione dell'infezione tubercolare sono condizionati da diversi fattori:

1. Fattori esogeni: probabilità di contatto con un caso indice, durata del contatto, caratteristiche dell'ambiente in cui esso si realizza (dimensioni della stanza, tipo di ventilazione, ecc.);
2. Fattori legati al microrganismo: carica batterica e virulenza;
3. Fattori legati all'ospite: integrità funzionale del sistema immunitario e altre variabili biologiche. Infatti, i soggetti affetti da HIV o che presentano un deficit dell'immunità cellulo-mediata presentano una maggiore suscettibilità all'infezione rispetto ai soggetti con un sistema immunitario efficiente (Havlir, et al., 1999).

Dopo l'esposizione, il 2% dei contatti immediatamente sviluppa una TB attiva, un terzo un'infezione latente e due terzi rimangono non infetti. Tra coloro che hanno un'infezione latente, solo il 10% evolverà verso una TB attiva nel corso della vita suggerendo che la risposta immunitaria riesce a controllare l'infezione (Diel, et al., 2006). L'interazione tra *Mtb* e l'ospite 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, e solo una frazione pari al 10% del totale raggiunge gli alveoli polmonari dove interagisce con le cellule dendritiche (DC), le cellule epiteliali e i macrofagi alveolari, che risultano essere gli ospiti preferenziali in quanto dotati di recettori di superficie che ne facilitano l'ingresso (Daëron, 1997). Il riconoscimento macrofagico di *Mtb* avviene grazie a diversi recettori

del fagocita, quali i recettori Toll-like (TRL), i recettori del complemento (CR1, CR2, CR3 e CR4), i recettori del mannosio, i recettori per il frammento Fc degli anticorpi (Fc) e quelli scavenger (Dhedda, et al., 2010). Essendo un microrganismo intracellulare, *Mtb* è un esempio di patogeno per il quale la risposta immune protettiva è basata sull'immunità cellulo-mediata (CMI). 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 antigenica e richiede l'intervento dei linfociti T helper CD4 (Th) (Figura 6).

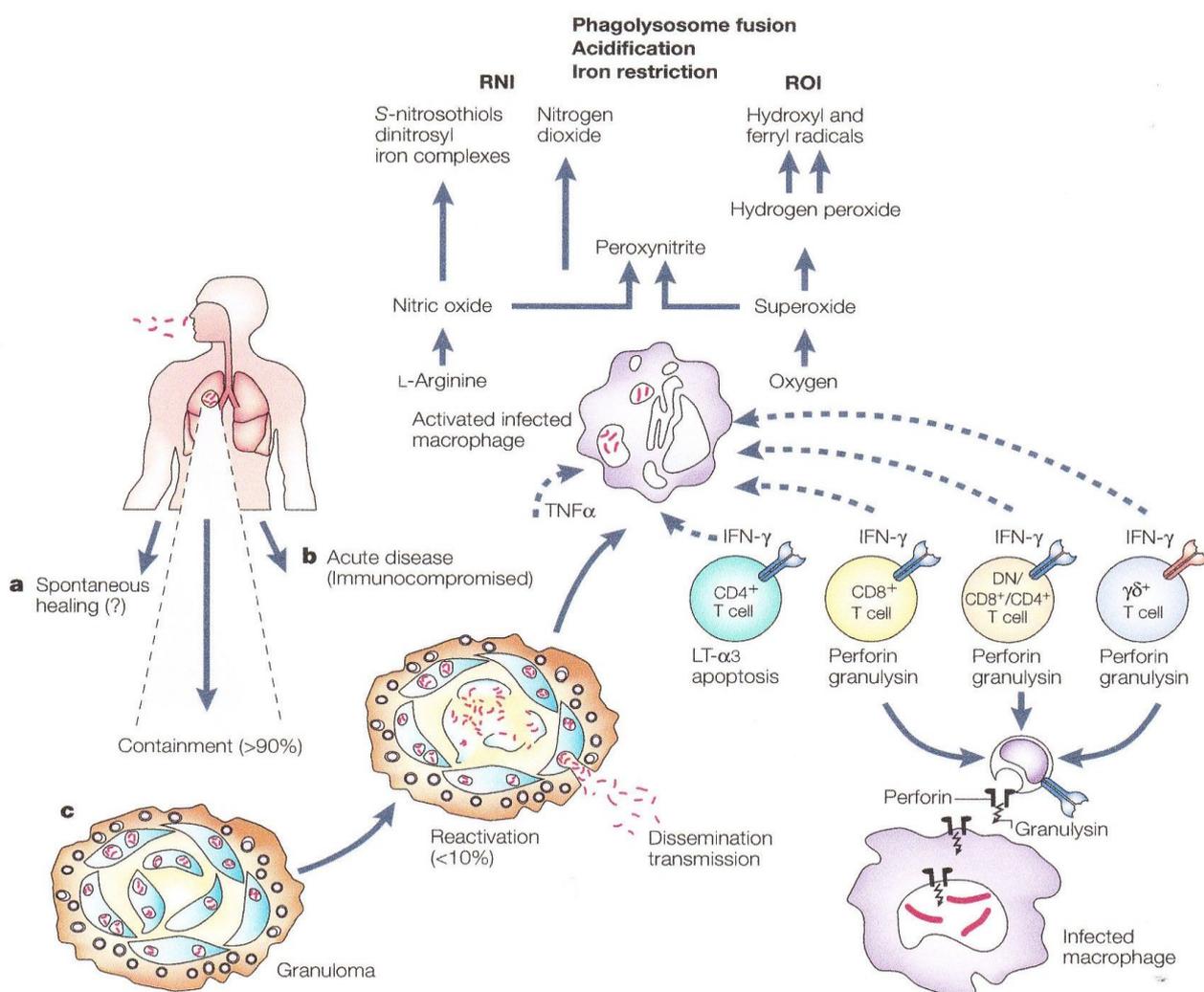


Figura 6: Immunopatogenesi della tubercolosi.

La risposta T cellulare verso *Mtb* viene attivata nei linfonodi mediastinici dove una popolazione di linfociti T CD4 naïve è capace di riconoscere, attraverso il recettore delle cellule T (TCR) $\alpha\beta$, gli antigeni tubercolari presentati dai fagociti in associazione al Complesso Maggiore di Istocompatibilità di tipo II (MHCII). L'attivazione dei linfociti T CD4 avviene grazie a due citochine pro-infiammatorie, IL-12 e IL-23, secrete dai macrofagi e dalle cellule dendritiche dopo il riconoscimento con il bacillo tubercolare. Una volta attivati, vanno incontro ad un' espansione clonale e si differenziano nei fenotipi Th1, Th2, Th17 e T-regolatori (Treg) (Marcos V. da Silva, et al., 2015). I linfociti Th17 producono IL-17 e IL-22, citochine coinvolte nelle fasi iniziali dell'infezione e responsabili del reclutamento di neutrofili, monociti e linfociti Th1 nel sito di infezione (Perreau, et al., 2013). Diversi studi hanno dimostrato che un'illimitata produzione di tali citochine determina un'esagerata infiammazione causando danno tessutale (Kaufmann SH, 2013). Una volta che i linfociti T CD4 si sono differenziati in linfociti Th1, essi migrano al di fuori dei linfonodi per giungere al sito di infezione dove producono interferon- γ (IFN- γ) e tumor necrosis factor- α (TNF- α), citochine che determinano l'attivazione dei meccanismi antimicrobici all'interno dei macrofagi infettati. La continua stimolazione della produzione di IFN- γ e TNF- α da parte dei linfociti T CD4 è fondamentale per il controllo dell'infezione tubercolare; infatti, i soggetti con patologie nelle quali vi sono difetti qualitativi e/o quantitativi di tali cellule, come l'infezione da HIV, sono fortemente a rischio di tubercolosi, in quanto incapaci di produrre sufficienti quantità di tali citochine (Flynn and Chan, 2001). Un fattore importante che influenza l'esito dell'infezione tubercolare è l'equilibrio tra la risposta Th1 e Th2. Queste due sottopopolazioni producono effetti diametralmente opposti sull'attivazione macrofagica: i Th1 esplicano un'azione stimolatoria mediante la produzione di IFN- γ e TNF- α , mentre i Th2, mediante la secrezione di IL-4, IL-5 e IL-10 esercitano un'azione inibitoria. Per molti anni si è pensato che il ruolo principale fosse svolto dai linfociti T CD4, recenti lavori hanno invece dimostrato che anche i linfociti T CD8, e altre cellule T hanno un importante ruolo nel controllo dell'infezione tubercolare.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

17

Sebbene il ruolo dei linfociti T CD8 nella tubercolosi è meno chiaro rispetto a quello dei linfociti T CD4, essi giocano un ruolo critico e complesso nell'immunità e nella protezione verso l'infezione tubercolare. I linfociti T CD8 riconoscono gli antigeni presentati dalle molecole MHC di classe I. Al contrario della via di presentazione di classe II, quella di classe I è meno immediata per antigeni inizialmente contenuti nel fagosoma, questo perché essi dovranno prima attraversare la membrana fagosomiale e poi raggiungere il citoplasma. Alcuni antigeni di *Mtb* possono essere presentati alle molecole MHCI ed attivare i linfociti CD8 attraverso una via definita cross-presentazione (Canaday, et al., 1999). Infatti è stato dimostrato che i fagosomi posseggono tutti gli elementi necessari per la cross-presentazione degli antigeni micobatterici nel contesto delle molecole MHCI (Houde, et al., 2003). Questo studio suggerisce un modello in cui le idrolasi acide acquisite durante la maturazione del fagosoma, iniziano la degradazione degli antigeni micobatterici, che successivamente vengono traslocati sul lato citoplasmatico della membrana fagosomiale per mezzo di una proteina chiamata sec61. Gli antigeni traslocati vengono degradati dal proteosoma, assemblato sul lato citoplasmatico del fagosoma, e generano peptidi che, attraverso la proteina associata alla processazione dell'antigene (TAP), vengono trasportati nel lume del reticolo endoplasmatico (RE). Successivamente si ha la fusione RE-fagosoma e gli antigeni micobatterici si legano alle MHC I per essere presentati ai linfociti T CD8. I linfociti T CD8 riconoscono diversi antigeni di *Mtb* che non sono presentati dalle molecole MHC, bensì da molecole non polimorfiche come la molecola CD1, che presenta principalmente antigeni glicolipidici del micobatterio (Moody, et al., 1999). Nel corso dell'infezione tubercolare i linfociti T CD8 producono IFN- γ e TNF- α ed agiscono come cellule citotossiche lisando le cellule bersaglio per mezzo di granzimi, perforina o mediante il legame Fas/ligando di Fas (Canaday et al. 2001). Queste cellule producono anche la granulosina che, entrando attraverso i pori formati dalla perforina, agisce direttamente su *Mtb* uccidendolo (Stenger S, et al., 1998). Anche i linfociti T γ/δ , anch'essi capaci di produrre IFN- γ , svolgono un'azione citotossica per i macrofagi infettati e possono contribuire al contenimento della crescita di *Mtb*, riconoscendo specifiche molecole micobatteriche (Stenger et Modlin, 1999). *M. tuberculosis* è in

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

grado di evadere la risposta immunitaria dell'ospite, mettendo in atto una serie di meccanismi di evasione dalla risposta macrofagica. Pertanto la sua sopravvivenza e la sua replicazione all'interno dei macrofagi, giocano un ruolo centrale nella patogenesi della tubercolosi. Uno di questi meccanismi è rappresentato dall'inibizione della fusione del fagosoma con il lisosoma che rappresenta il meccanismo chiave attraverso il quale questi patogeni riescono a sopravvivere all'interno dei macrofagi (Armstrong et Hart, 1975). Un ruolo fondamentale nell'impedire al fagosoma contenente il micobatterio di fondersi con il lisosoma è stato attribuito alla tryptophan aspartate-containing coat protein (TACO) (Tailleux et al., 2003). Dal momento che questa proteina viene rilasciata prima di tale fusione (Grogan et al., 1997), il persistere della sua espressione sul fagosoma contenente *Mtb* rappresenta un segno distintivo. Infatti, in macrofagi murini l'espressione di TACO è mantenuta nei fagosomi contenenti micobatteri vivi, mentre viene persa rapidamente da quelli contenenti micobatteri morti, permettendo così la successiva fusione al lisosoma (Ferrari et al., 1999). Altri meccanismi di evasione sono rappresentati dall'inibizione dell'acidificazione del fagosoma dovuto ad un arresto delle H⁺ ATPasi di membrana (Sturgill-Koszycki et al., 1994) e dall'inibizione dell'aumento della concentrazione degli ioni Ca²⁺ del fagosoma. Diverse evidenze dimostrano che l'inibizione dell'aumento del Ca²⁺ nei macrofagi è fondamentale nella patogenesi della tubercolosi. Infatti, è stato dimostrato che, durante la fagocitosi del bacillo tubercolare, un aumento di tale ione nel citoplasma favorisce la maturazione dei fagosomi ed una migliore uccisione intracellulare dei bacilli tubercolari (Malik et al., 2003). Tale aumento è determinato dall'attivazione dell'enzima macrofagico, sfingosina chinasi, che catalizza la conversione della sfingosina in sfingosina 1-fosfato, un lipide che stimola il rilascio del Ca²⁺ dalle riserve intracellulari (Spiegel et al., 2002). Inoltre l'attivazione della sfingosina chinasi è accompagnata dalla sua traslocazione dal citoplasma alla regione di formazione del fagosoma. *Mtb* inibisce l'attivazione di tale enzima e la sua traslocazione al fagosoma contenente il micobatterio (Kusner, 2005) (Figura 7).

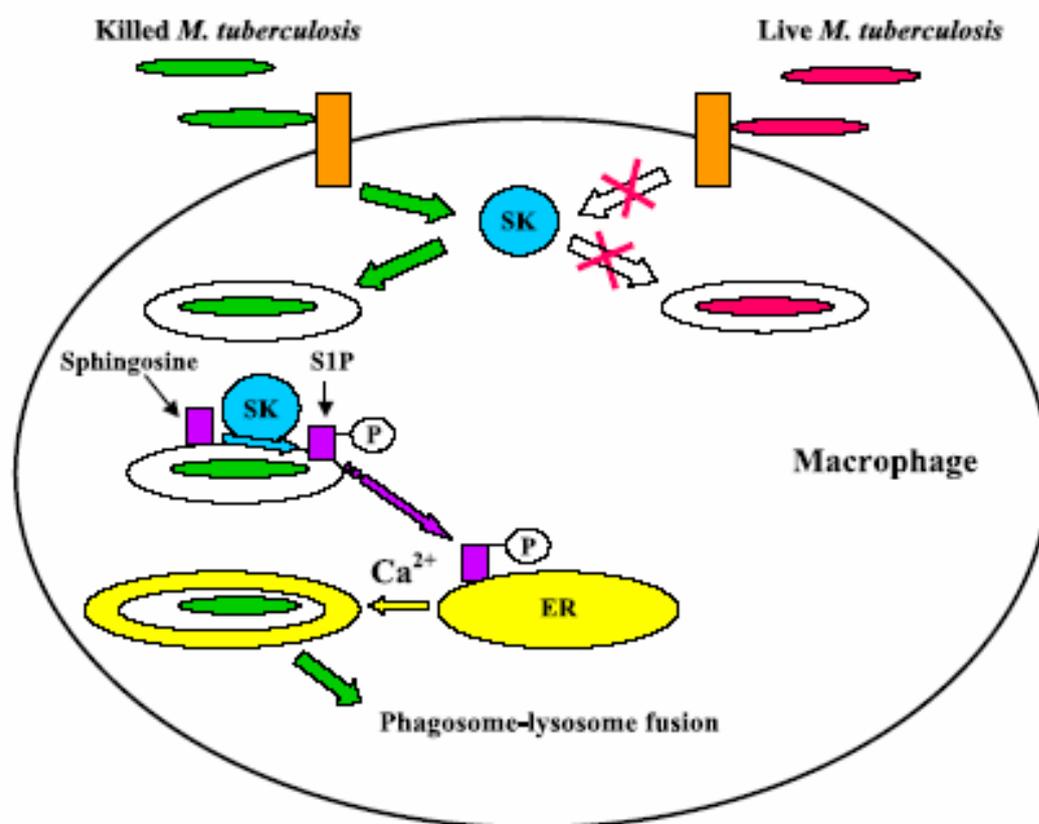


Figura 7: Blocco della maturazione del fagolisosoma.

Altri meccanismi di evasione sono rappresentati dalla resistenza all'attività svolta dagli intermedi reattivi dell'ossigeno e dell'azoto. Diversi studi hanno indicato come il LAM sia implicato in tali meccanismi di resistenza. Infatti, esso inibisce l'attività delle fosfolipasi D macrofagiche implicate nella maturazione del fagolisosoma, della proteina chinasi C che gioca un ruolo importante nella produzione dei ROI e di IFN- γ , fondamentale per l'attivazione macrofagica (Chan et al 1991). Tali meccanismi di evasione consentono ai bacilli tubercolari di moltiplicarsi all'interno dei macrofagi, di diffondere nell'ambiente extracellulare attraverso la lisi della cellula fagocitica e infettare altri macrofagi. Pertanto una loro più approfondita conoscenza potrebbe aiutare a combattere la tubercolosi.

Il sistema immunitario limita la disseminazione tramite la formazione del granuloma. Si tratta di una struttura tessutale costituita da macrofagi, monociti, linfociti T CD4 e CD8,

neutrofili, cellule epiteliodi e cellule giganti multinucleate di Langhans, entrambe di derivazione macrofagica. Questo cordone di cellule previene la disseminazione del patogeno e focalizza la risposta immunitaria intorno al focolaio di infezione (Figura 8).

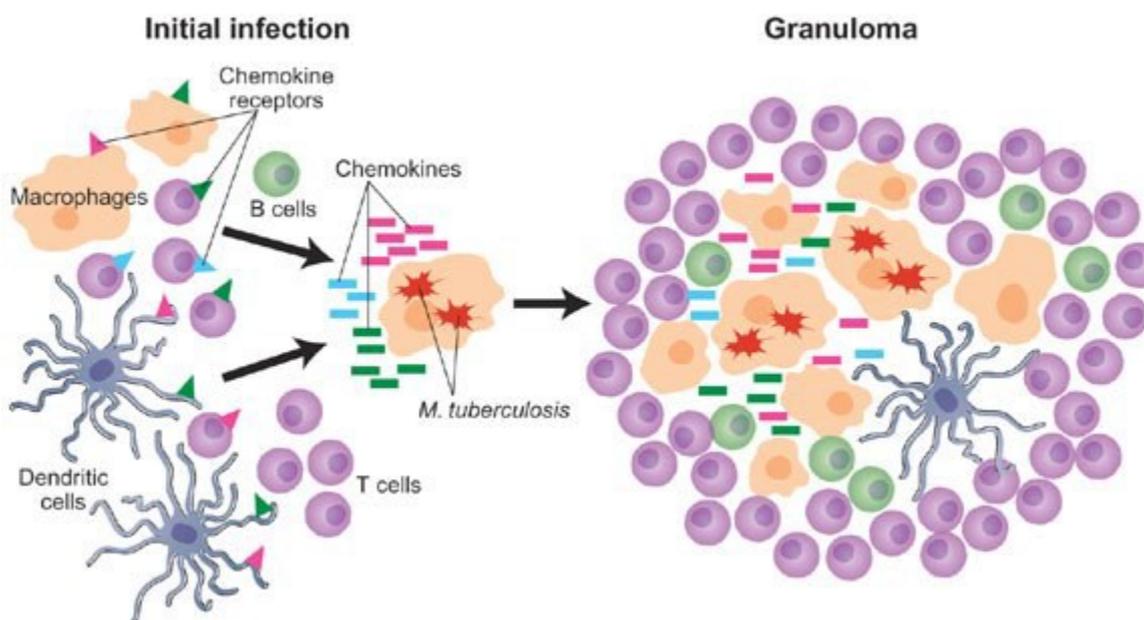


Figura 8: Formazione del granuloma.

Dopo due o tre settimane dall'infezione, l'attivazione massiva dei macrofagi nel granuloma determina il rilascio degli enzimi litici che distruggono i macrofagi non attivati contenenti bacilli in moltiplicazione producendo una necrosi tessutale che conferisce alla lesione una consistenza caseosa. Si viene a generare una risposta immunitaria detta "ipersensibilità di tipo ritardato" (Delayed-Type Hypersensitivity, DHT) che coinvolge i linfociti T helper, specialmente quelli di tipo1. Tale reazione, apparentemente svantaggiosa, costituisce in realtà una potente modalità di controllo della moltiplicazione dei micobatteri. Il micobatterio non può replicarsi all'interno dell'ambiente caseoso, perché privo di ossigeno e fortemente acido, ma vi può sopravvivere in uno stato di quiescenza per anni riducendo le sue attività metaboliche e replicative, la cosiddetta "fase di latenza del micobatterio" (Cosma et al, 2003). Dopo la terza settimana d'infezione, la malattia può seguire un decorso diverso a seconda della

relazione che si instaura tra la risposta DTH e la CMI. Nel paziente immunocompetente si ha lo sviluppo di un'efficace CMI, e si assiste ad una neutralizzazione dei bacilli che fuoriescono dal centro caseoso per la potenziata attività di killing macrofagica, senza più distruzione tessutale. Il granuloma cessa di crescere e guarisce, lasciando una lesione fibrotica e calcificata (complesso primario), all'interno della quale può trovarsi il micobatterio in fase quiescente. I linfociti T CD4 tengono sotto controllo l'infezione e proteggono l'individuo da re-infezioni successive. L'individuo, pertanto, rimane infetto ma non sviluppa la malattia (TB primaria). Nell'individuo con un sistema immunitario debole, come neonati, anziani o soggetti HIV positivi, l'infezione primaria può progredire in malattia. In questo caso si sviluppa una debole CMI e la proliferazione micobatterica viene arrestata dalla DTH che determina una massiva distruzione tessutale. La lesione tende ad ingrandirsi, il materiale caseoso va incontro a liquefazione: le pareti bronchiali vengono invase e distrutte con formazione di caverne tubercolari, favorendo sia la disseminazione extrapolmonare del microrganismo sia quella ambientale. I fattori scatenanti la liquefazione non sono chiari, anche se sembra che il fenomeno sia associato con un elevato tasso di enzimi proteolitici come proteasi, nucleasi e lipasi. Nella maggior parte dei casi, lo sviluppo della TB si presenta tipicamente in seguito alla riattivazione di un focolaio estinto (TB post-primaria), piuttosto che come conseguenza diretta di un'infezione primaria. Nonostante ci siano numerosi studi sull'argomento, ancora non è completamente chiaro come l'infezione latente si possa trasformare in malattia attiva. Alcuni studi suggeriscono il coinvolgimento di alcuni fosfolipidi e proteine batteriche (Zhang et al., 2001); recentemente è stato ipotizzato anche il coinvolgimento di cinque proteine chiamate "Resuscitation Promoting Factors", (RpfA-E) codificate dai geni rpf (Gupta et Srivastava, 2012). Ulteriori studi su questi fattori possono essere di aiuto nello sviluppo di vaccini e farmaci, che possono controllare in modo efficace entrambe le forme di tubercolosi.

Diagnosi dell'infezione tubercolare

La tubercolosi è una patologia infettiva che si presenta in due forme cliniche, l'infezione tubercolare latente (LTBI) e la malattia attiva (TB attiva), che corrispondono a due fasi distinte della storia naturale dell'infezione. Le differenze tra le due condizioni comprendono:

1. carica di micobatteri presente nel polmone (bassa nella LTBI, alta nella TB attiva);
2. contagiosità (assente nella LTBI, potenziale nella TB attiva);
3. sintomatologia clinica (assente nella LTBI, spesso presente nella TB attiva);
4. esami microbiologici e radiologici (normali nella LTBI, alterati nella TB attiva).

Pertanto, la diagnosi e il trattamento della TB attiva e della LTBI costituiscono priorità assolute, soprattutto nei paesi a bassa incidenza, al fine di controllare la diffusione della TB (Jensen et al., 2005). Il gold standard nella diagnosi di TB attiva rimane a tutt'oggi l'esame colturale, eseguito su terreni di coltura sia solidi che liquidi, che richiede però tempi lunghi, data la lenta crescita del micobatterio. Tradizionalmente, la diagnosi di infezione tubercolare latente viene eseguita mediante il test cutaneo della tubercolina (TST), più noto come intradermoreazione di Mantoux. Il TST rileva la reazione di ipersensibilità di tipo ritardato prodotta in risposta all'inoculo di un derivato proteico (PPD) in soggetti venuti a contatto con *Mtb*. L'attuale conoscenza relativa all'utilità del TST deriva in larga misura da una serie di studi in popolazioni ben definite: soggetti affetti da TB, soggetti a rischio molto basso di LTBI e nei soggetti contatti stretti di pazienti affetti da TB attiva. Sebbene il TST sia diffusamente utilizzato da circa 100 anni e sia il test universalmente riconosciuto per la diagnosi di LTBI presenta importanti limiti. Il PPD è costituito da una miscela di circa 200 diversi antigeni, molti dei quali sono presenti oltre che nel *M. tuberculosis*, anche nel *M. bovis* BCG e in molti altri micobatteri non tubercolari. La cross-reattività antigenica esistente tra PPD, micobatteri non tubercolari e BCG è responsabile di una certa quota di falsi positivi. Questa cross-reattività limita di molto la specificità del TST (Farhat et al., 2006). In più, la sensibilità del TST è ridotta proprio in alcune categorie di soggetti potenzialmente a maggior

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

rischio di sviluppare una TB attiva a seguito di una riattivazione di un'infezione tubercolare. Questo è il caso di pazienti con immunodepressione (in modo particolare l'infezione da HIV) o in trattamento con farmaci immunosoppressivi, in cui il TST può produrre un risultato falsamente negativo. Infatti, nei pazienti HIV positivi il TST è positivo solo nel 40-70% dei casi, percentuale che scende ulteriormente all'11-60% nei pazienti con AIDS. Altri limiti del TST sono rappresentati dal fatto che è un test in vivo, che necessita di una visita di controllo per la lettura del risultato. Inoltre, sia l'inoculo che la lettura sono operatore-dipendente ed entrambe dimostrano una notevole variabilità (Pouchot et al., 1997). Per superare alcuni limiti del TST, le linee guida dell'American Thoracic Society hanno stabilito diversi cut-off per l'interpretazione dell'esito del test, a seconda del livello di rischio di infezione tubercolare o di riattivazione di una precedente infezione. Un indurimento ≥ 5 mm è definito positivo nei soggetti ad alto rischio di infezione o riattivazione (ad esempio nei contatti recenti con pazienti affetti da TB attiva o in individui HIV positivi), un indurimento ≥ 10 mm è definito positivo per i soggetti a rischio medio (ad esempio nei pazienti con patologie croniche o nei residenti o lavoratori in strutture residenziali ad alto rischio quali carceri, ospedali, strutture sanitarie e case di riposo), infine un indurimento ≥ 15 mm è considerato positivo nei soggetti non a rischio. Nella maggior parte degli individui la reattività del TST si mantiene per tutta la vita, sebbene la misura dell'intensità della risposta cutanea possa decrescere nel corso del tempo e addirittura scomparire, come nei soggetti portatori di infezione tubercolare acquisita in passato, anziani e soggetti vaccinati con BCG (Menzies, 1999). In questi individui la risposta del test iniziale (1° TST) può essere minima o assente, ma la ripetizione di un secondo test con una nuova dose di PPD (2° TST) può stimolare (boost) la sensibilità di tali individui al test. Tale fenomeno è di particolare rilevanza operativa nei programmi di screening periodico, in quanto l'effetto booster può condurre ad una errata interpretazione del TST. In casi del genere, per definire una linea di base accurata, un secondo test viene effettuato entro 1-3 settimane dopo un test iniziale che ha dato un risultato negativo. Questo protocollo consente di stabilire la presenza di un'infezione distante nel tempo. In aggiunta, il TST consente solo la diagnosi di infezione e non di malattia attiva, fattore che limita l'utilità

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

diagnostica del test, soprattutto nei paesi ad elevata endemia di TB. Malgrado tutti i suoi limiti il TST è rimasto nell'uso clinico per molti anni in quanto non si è riusciti a trovare un valido test alternativo per la diagnosi di LTBI. Recentemente sono stati sviluppati nuovi test diagnostici che hanno aumentato la sensibilità e la specificità dell'infezione tubercolare (Thillai et al., 2014). Alla fine degli anni '90, il sequenziamento completo del genoma di *M. tuberculosis* ha permesso di identificare un segmento, denominato "region of difference 1" (RD1), assente in *M. bovis* BCG e nella maggior parte dei micobatteri ambientali (Cole et al., 1998). Due proteine codificate dalla RD1, denominate *early secretory antigenic target-6* (ESAT-6) e *culture filtrate protein-10* (CFP10), sono importanti bersagli delle cellule Th1 nei pazienti con infezione tubercolare (Mahairas et al., 1996). La risposta cellulo-mediata a questi antigeni costituisce uno specifico marcatore di infezione tubercolare. Attualmente sono disponibili 2 saggi immunologici che impiegano questi antigeni e che si basano sul rilascio di IFN- γ da parte dei linfociti T stimolati (IGRAs: Interferon- γ release assays). Uno è il T SPOT-TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK), l'altro è il QuantiFERON-TB Gold (QFT; Qiagen AG, Hombrechtikon, Switzerland). Il T SPOT-TB, basato sulla tecnica ELISpot (EnzymeLinkedImmunospotAssay) determina il numero di cellule T che secernono IFN- γ (Lalvani et al., 2001), mentre il QFT, basato sulla tecnica ELISA (EnzymeLinkedImmunsorbentAssay), misura la concentrazione di IFN- γ prodotto (Brock et al., 2006) (Figura 9).

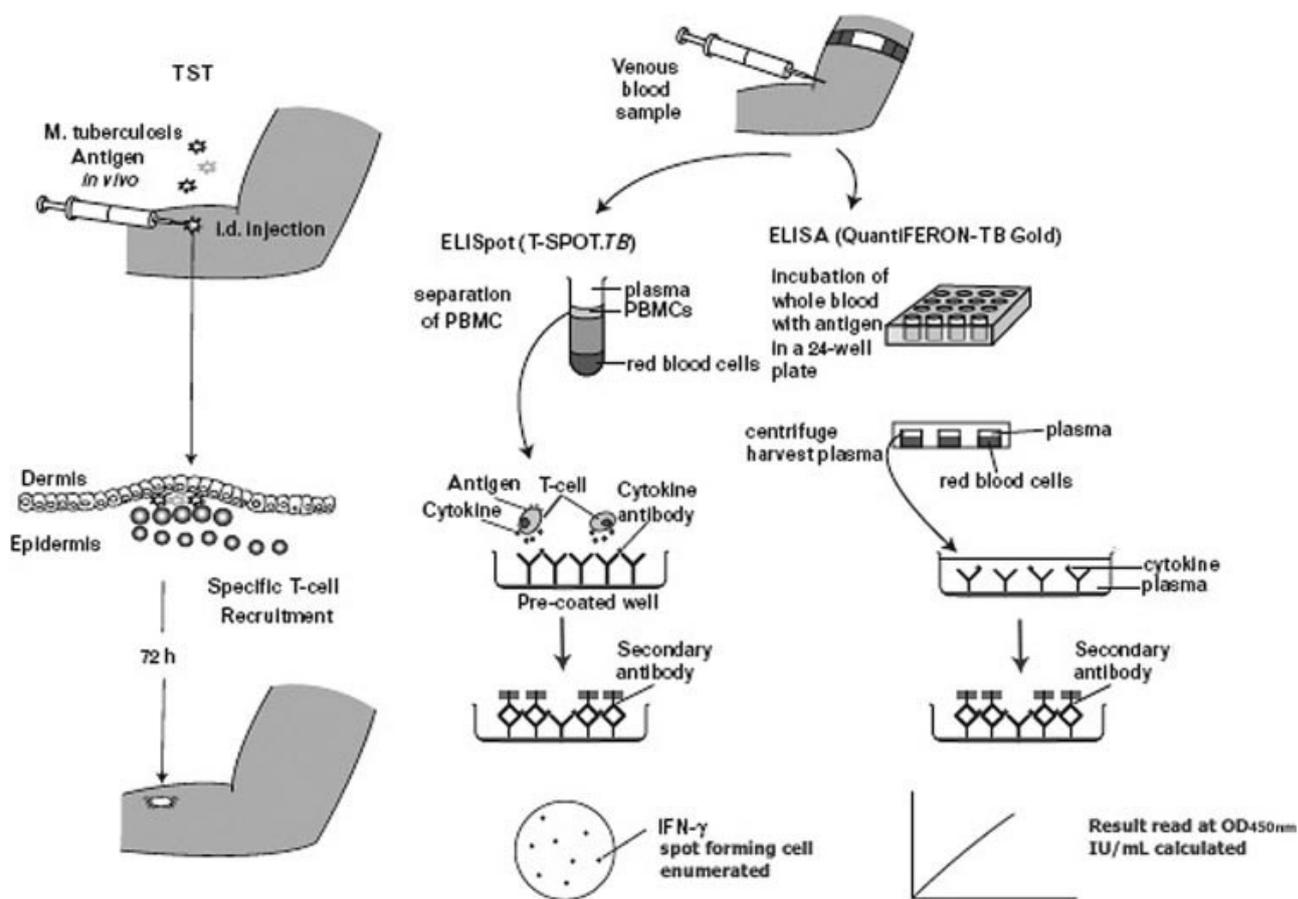


Figura 9: Rappresentazione dei saggi T-SPOT.TB e QuantiFERON-TB Gold.

Nel 2001, questi test hanno ottenuto l'approvazione per l'uso clinico negli Stati Uniti dalla Food and Drug Administration (FDA), quale valido strumento per la diagnosi di LTBI in selezionate condizioni cliniche e avvalorato dalle Linee Guida dei Centers for Disease Control of Prevention (CDC) di Atlanta nel dicembre 2002 (Mazurek et Villarino, 2003). Da settembre 2004 esiste una nuova versione del QuantiFERON-TB Gold, il QuantiFERON TB Gold In-Tube (QFT-GIT), che utilizza un altro antigene, il TB7.7 (Rv2654), anch'esso specifico per *Mtb*. Il gene per TB7.7 è stato mappato nella regione RD11 del genoma di *M. tuberculosis* (Aagaard et al., 2004). Le maggiori differenze tra il QFT-TB, il T SPOT-TB e TST sono indicate nella tabella 2.

	QuantiFERON-TB Gold	T SPOT-TB	TST
Setting del test	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Antigeni	ESAT-6, CFP-10, TB7.7	ESAT-6 e CFP-10	PPD
Cross-reattività con BCG	No	No	Si
Cross-reattività con NTM	No	No	Si
Controllo positivo interno	Si	Si	No
Effetto boosting in test ripetuti	No	No	Si
Necessità di visita di ritorno	No	No	Si
Tempi richiesti per il risultato	24h	24h	72h
Interpretazione del test	Oggettivo (instrument based)	Oggettivo (instrument based)	Soggettivo (operator-based)
Tipo di risultato del test	Concentrazione sierica di IFN- γ espressa in UI/ml	n° di linfociti T antigene specifici	Millimetri di indurimento
Metodica utilizzata	ELISA	ELISPOT	-
Substrato	Sangue intero	Cellule polimorfonucleate	-
Sistema di lettura	Misura dei valori di intensità ottica utilizzando un lettore automatizzato	Conteggio del numero di spot utilizzando un lettore automatizzato	Misura del diametro di indurimento

Tabella 2. Caratteristiche del TST e dei test IGRA.

Non è facile dimostrare la superiorità dell'accuratezza diagnostica di un test diagnostico rispetto ad un altro quando, come nel caso dell'infezione tubercolare latente, non esiste un gold standard per la diagnosi. Questa lacuna è stata parzialmente colmata da alcune approssimazioni metodologiche basate sulla conoscenza della storia naturale della tubercolosi e sulla sua epidemiologia. La conoscenza che la trasmissione per via aerea di *Mtb* è favorita da contatti stretti e prolungati con un caso indice e dal tempo trascorso

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

27

nello stesso ambiente confinato è stata utilizzata per generare l'ipotesi che se un nuovo test è un marker migliore di LTBI rispetto al TST, dovrebbe correlare maggiormente con il livello di esposizione ad un caso di TB attiva rispetto al test cutaneo e non dovrebbe essere influenzato dalla vaccinazione BCG (Lalvani et al., 2001). Numerosi studi hanno determinato il valore diagnostico, in termini di sensibilità e specificità, dei test IGRA. In una recente analisi (Pai et al., 2008), finalizzata alla stima della sensibilità dei test diagnostici per la LTBI, sono stati considerati gli studi relativi a pazienti con tubercolosi attiva confermata microbiologicamente; mentre in un'analisi precedente (Menzies et al., 1999) sono stati considerati studi relativi a contatti con un caso bacillifero in cui sono stati definiti e distinti i gradi di esposizione (alta e bassa esposizione). La stima della sensibilità, utilizzando la malattia tubercolare come surrogato di LTBI, è risultata essere del 78% per il QFT-TB Gold, del 70% per il QFT-TB Gold In-Tube e del 90% per il T SPOT-TB. La sensibilità del TST è risultata del 70%. Tuttavia, né il TST né i saggi IGRA hanno un valore diagnostico per la malattia attiva dal momento che non rilevano direttamente il bacillo tubercolare; essi si limitano solo ad indicare una risposta immune cellulare di recente o remota sensibilizzazione a *Mtb*. Nell'analisi dove è stata stimata la sensibilità dei test utilizzando il gradiente di esposizione come indicatore di probabilità di LTBI, è emersa la criticità riscontrata nell'analisi dei vari studi in quanto ciascun studio aveva caratterizzato in modo diverso il tipo di esposizione. Seppure con questi limiti, l'analisi ha evidenziato che la prevalenza di risultati positivi, nei soggetti ad alta esposizione, è elevata sia per i test IGRA che per il TST; mentre la prevalenza di risultati positivi nei soggetti a bassa esposizione è maggiore per il TST rispetto ai test IGRA, per la presenza di soggetti con pregressa vaccinazione con BCG (esiti falsamente positivi). La specificità è stata stimata analizzando la proporzione di test negativi tra i soggetti sani, con o senza BCG vaccinazione, che vivono in paesi a bassa incidenza di TB. La specificità è risultata essere del 98% negli studi relativi al QFT-TB Gold: in particolare del 99% nei soggetti non vaccinati con BCG e del 96% nei soggetti vaccinati. La specificità del T SPOT-TB, senza distinzione tra soggetti BCG vaccinati o non, risultava del 93%. La specificità del TST risultava essere elevata nei soggetti non vaccinati (97%), mentre nella popolazione

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

BCG vaccinata la specificità risultava molto bassa e molto variabile nei vari studi condotti. Pertanto, l'elevata specificità dei test IGRA permette di eliminare i test falsamente positivi nei soggetti BCG vaccinati e l'elevata sensibilità permette di identificare un più alto numero di soggetti falsamente negativi al TST. Dal momento che la maggior parte degli studi sulla sensibilità e specificità dei saggi IGRA sono stati effettuati su soggetti adulti e su soggetti immunocompetenti; sono poche le informazioni riguardanti la sensibilità e la specificità di questi test nei bambini e nei soggetti immunodepressi. Infatti i dati di letteratura sull'accuratezza di tali saggi in età pediatrica sono limitati, particolarmente riguardo ai bambini di età inferiore ai 5 anni e la maggior parte di essi designano una buona concordanza tra questi test e il TST indicando che entrambi possono essere impiegati per la diagnosi di infezione tubercolare. Nei soggetti il cui lo stato immunitario è compromesso, come i soggetti HIV positivi, gli studi condotti sinora hanno dimostrato che in generale la sensibilità dei saggi IGRA è maggiore rispetto a quella della tubercolina, sebbene essa si riduca quando la conta dei CD4 è compromessa. Dal momento che i saggi IGRA non risentono dell'effetto boosting, possono essere utilizzati per lo screening periodico degli operatori sanitari, che costituisce un'importante componente dei programmi di controllo dell'infezione tubercolare (Jensen, et al., 2005). Infatti, è noto da molti anni che la trasmissione di *Mtb* costituisce un importante rischio lavorativo per gli operatori sanitari rispetto ad altre categorie lavorative. L'entità del rischio varia dall'ambito lavorativo, dalla prevalenza della TB nella comunità, dalla tipologia di pazienti assistiti e dall'efficacia delle misure di prevenzione e di controllo attuate. I noti limiti del TST, in particolare relativi al fenomeno boosting, alle conversioni e reversioni che si possono evidenziare, lo rendono un test problematico nell'utilizzo delle ripetizioni seriali (Menzies, 1999). Un altro problema è rappresentato dalla falsa positività del TST dovuta alla pregressa vaccinazione con BCG, obbligatoria in Italia fino al 2001 per tutti gli operatori sanitari cutinegativi. I test IGRA hanno diverse caratteristiche che li rendono dei test ideali nelle ripetizioni seriali: sono più specifici, non cross-reagiscono con il BCG, possono essere ripetuti senza sensibilizzare il soggetto evocando così il fenomeno boosting. Finora la riproducibilità dei risultati dei test IGRA è stata approfondita, seppure con pochi studi,

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

solo relativamente al QFT-TB, grazie alla maggiore versatilità di questo test rispetto al T SPOT-TB, che ne permette l'utilizzo in numerosi e diversi contesti di indagine. Tra questi studi solo uno ha avuto come oggetto gli operatori sanitari (Pai et al., 2006). Un importante filone di interesse scientifico è orientato all'analisi della variabilità del dato quantitativo del QFT-TB espresso in UI/ml e dei possibili fattori che possono influenzare l'esito del test: sia le problematiche di tipo tecnico-procedurali sia la variabilità biologica della risposta individuale (Perry et al., 2008). Un ulteriore filone di interesse, parallelo al precedente, riguarda l'analisi dei soggetti con conversioni e reversioni al fine di trovare un consenso in merito alla definizione di queste situazioni, che attualmente non esiste (Pai et al., 2009). In alcuni casi i test IGRA possono dare valori indeterminati, di difficile interpretazione e comunemente associati ad uno stato di soppressione della risposta immunitaria. Questi risultati sono frequenti nei soggetti HIV positivi, nei quali la conta dei linfociti T CD4 è bassa e nei soggetti di età inferiore di 5 anni e maggiore di 80 anni. Le linee guida europee raccomandano l'uso dei test IGRA nei seguenti gruppi: individui ad alto rischio di LTBI con un TST positivo e individui immunodepressi che comunemente hanno un TST negativo. Al contrario le linee guida americane suggeriscono l'uso di tali test in tutti i gruppi, sostituendoli al TST. Sebbene i saggi basati sul rilascio di IFN- γ risultino essere più accurati, un loro limite è quello di non essere in grado di discriminare tra infezione tubercolare latente e malattia attiva. Inoltre non possono essere utilizzati per monitorare l'efficacia della terapia antitubercolare. In assenza di un gold standard, la citofluorimetria tenta di fornire un efficace metodo di decodificazione della risposta immunitaria dell'uomo a *Mtb* e anche una rapida diagnosi dell'infezione tubercolare. È una tecnica che rende possibile la misurazione di molteplici proprietà di singole cellule, all'interno di una popolazione eterogenea, ad una velocità molto rapida (1000 cellule al secondo), permettendo una dettagliata analisi quantitativa e qualitativa. Viene usata in diverse applicazioni che vanno dallo studio della ploidia e della proliferazione cellulare, all'analisi immunofenotipica multiparametrica, alla conta cellulare fino all'analisi dell'espressione genica. Nel contesto della tubercolosi, la citofluorimetria è ancora oggi limitata al campo della ricerca e, pertanto, ha uno scarso impatto sulla gestione clinica del

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

paziente. Tuttavia, il numero di studi che usano la citofluorimetria per determinare la risposta immune contro la tubercolosi sono aumentati negli ultimi anni e prove promettenti suggeriscono che può essere utile, non solo come strumento di ricerca ma anche come valido strumento clinico grazie ai suoi vantaggi rispetto ai saggi immunologici attualmente disponibili. Infatti, non solo definisce il numero di cellule che producono una data citochina, ma determina anche la differenziazione fenotipica tra i diversi subset dei linfociti T antigeni-specifici, coinvolti nella malattia attiva e nell'infezione latente (Sester et al., 2011). Inoltre, diversamente dai saggi IGRA e dal TST, la sua performance diagnostica non è influenzata dalla presenza di stati immunosoppressivi, dalla vaccinazione con BCG e dalla cross-reattività con micobatteri non tubercolari. Pertanto, la citofluorimetria potrebbe essere un potenziale strumento diagnostico che permette di individuare in modo rapido e specifico i soggetti infettati da *Mtb*, ma soprattutto in grado di discriminare gli individui con infezione latente da quelli con malattia attiva.

Infezione tubercolare latente e malattia attiva

Uno dei principali problemi nella lotta contro la tubercolosi è la corretta diagnosi dei suoi due differenti stati: malattia attiva e infezione tubercolare latente. Molti studi hanno valutato gli aspetti immunologici della LTBI e della TB attiva, per capire quali componenti della risposta immunitaria dell'ospite o quali antigeni tubercolari, possano essere usati per discriminare tra malattia attiva e infezione tubercolare latente. In alcuni di questi studi è stato valutato se ci fossero differenze nella produzione di IFN- γ o di altre citochine o chemochine, importanti nella patogenesi e nel controllo dell'infezione tubercolare. Si è visto che i casi di TB attiva sono associati con una maggiore produzione di TNF- α , mentre gli individui con infezione tubercolare latente sono caratterizzati da una maggiore produzione di IFN- γ e IL-2. Diversi studi hanno mostrato che linfociti T CD4 e CD8, definiti linfociti T multifunzionali, in quanto secernono simultaneamente differenti citochine, conferiscono protezione verso alcuni tipi di infezioni virali e batteriche. Mentre il ruolo di questi linfociti multifunzionali nella protezione verso le infezioni virali croniche, come l'HIV e l'epatite C e altri patogeni intracellulari, come *Leishmania major*, è stato dimostrato, i dati sul loro ruolo verso *Mtb* sono ancora limitati. Alcuni studi hanno focalizzato l'attenzione sui linfociti multifunzionali che, nella TB attiva e nella LTBI, producono contemporaneamente IFN- γ e IL-2 oppure solo IFN- γ o IL-2. Questi differenti subset di linfociti T sono stati associati con diversi stati clinici e carica antigenica e la loro quantificazione è un promettente approccio per la diagnosi e il monitoraggio delle malattie infettive. Questi studi suggeriscono che gli stati caratterizzati da una bassa carica antigenica, come la TB trattata o l'infezione latente, sono associati con un profilo immunologico dominato dalle cellule T che secernono IFN- γ /IL-2 e cellule T che secernono solo IL-2; al contrario, gli stati caratterizzati da un'elevata carica antigenica, come la TB non trattata, sono dominati da cellule T che secernono solo IFN- γ . Sester et al., in un lavoro del 2011, hanno valutato la produzione di IL-2 e di IFN- γ dopo stimolazione con PPD, ESAT-6 e CFP-10 in pazienti con TB attiva e in soggetti con uno stato non attivo, che comprendevano soggetti con TB trattata, individui con LTBI e individui vaccinati.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

Questo studio ha mostrato che dopo stimolazione con PPD il profilo della risposta immunitaria, nei soggetti con TB trattata, negli individui con infezione latente e in quelli vaccinati, è dominato da linfociti T che secernono IFN- γ / IL-2; al contrario, nei pazienti con TB attiva non trattata, il profilo immunologico è rappresentato da linfociti T che esprimono solo IFN- γ . Il profilo di citochine derivante dalla stimolazione con gli antigeni della RD1 non differiva invece tra i diversi gruppi saggiati. Nell'insieme gli autori hanno stabilito dei cut-off e hanno indicato che se, dopo stimolazione in vitro con PPD, la frequenza di CD4 con il profilo IFN- γ /IL-2 è inferiore al 56% si potrebbe presupporre lo stato di malattia. Altri studi hanno, invece, focalizzato l'attenzione sui linfociti T multifunzionali che secernono, nei due stati dell'infezione tubercolare, simultaneamente tre citochine (IFN- γ /TNF- α /IL-2), due citochine (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /IL-2 o TNF- α /IL-2) oppure una sola (IFN- γ o TNF- α o IL-2). In un lavoro di Harari et al. del 2011, è stato analizzato il profilo IFN- γ , TNF- α e IL-2 dei linfociti T multifunzionali in soggetti con TB attiva e in individui con infezione tubercolare latente. I risultati hanno mostrato che la risposta immunitaria nella TB attiva era dominata da linfociti T che esprimevano solo TNF- α , dimostrando che il TNF- α , e non l'IFN- γ , distingue chiaramente tra malattia attiva e infezione latente. Inoltre, un cut-off di 37.4% di linfociti T, che secernono TNF- α , è stato calcolato come valore che permette la migliore separazione tra TB attiva e LTBI (sensibilità del 100% e specificità del 96%). Un studio di Petruccioli et al (2013) ha mostrato che i linfociti T che esprimono simultaneamente TNF- α e IFN- γ sono associati allo stato di malattia piuttosto che all'infezione latente. Caccamo et al., in un lavoro del 2010, hanno valutato la distribuzione dei sette distinti stati funzionali dei linfociti T CD4 in individui con LTBI e TB attiva. Diversamente dagli studi precedenti, in questo studio, si è osservato che l'85-90% dei pazienti con TB attiva e solo il 10-15% degli individui con infezione tubercolare latente avevano linfociti T CD4 che esprimevano contemporaneamente tutte e tre le citochine (IFN- γ /IL-2/TNF- α). Al contrario, i soggetti con LTBI presentavano una più elevata proporzione di linfociti CD4 che esprimevano simultaneamente IFN- γ /IL-2 o solo IFN- γ rispetto ai pazienti con TB attiva. Questi differenti profili dei linfociti T CD4, che esprimono IFN- γ , TNF- α e IL-2, sembrano essere associati con la

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

carica batterica come indicato dal decremento dei linfociti T CD4 3+ (IFN- γ /IL-2/TNF- α) e dall'aumento dei linfociti T CD4 2+ (IFN- γ /IL-2) e dei linfociti T CD4 1+ (IFN- γ) nei pazienti TB dopo terapia anti-tubercolare. Questi dati suggeriscono che il fenotipo dei linfociti T CD4 potrebbe essere utile non solo per discriminare la TB attiva dall'infezione tubercolare latente, ma anche per monitorare l'efficacia della terapia antitubercolare. Diversi studi hanno valutato la possibilità che l'IL-2 potesse essere un potenziale biomarker in grado di discriminare tra infezione tubercolare latente e malattia attiva (Wang, et al., 2012, Kim et al., 2012). Biselli et al. in un lavoro pubblicato nel 2009, hanno analizzato queste due citochine utilizzando una versione modificata del QuantiFERON-TB. In questo studio è stato dimostrato che il rilevamento di IL-2, in associazione con quello dell'IFN- γ , consente di distinguere, oltre che i soggetti infettati da *Mtb* da quelli sani, anche tra quelli con LTBI e TB attiva. Gli studi, volti a chiarire il ruolo delle citochine coinvolte nella progressione da infezione latente a malattia attiva, hanno fatto luce in maniera limitata sulla resistenza o sulla suscettibilità dell'uomo all'infezione da *Mtb*. Più recentemente, diversi studi hanno provato ad usare un approccio genomico per identificare i fattori associati all'infezione tubercolare e nuovi biomarkers che siano in grado di differenziare la malattia attiva dall'infezione tubercolare latente. Tuttavia, i risultati di questi studi possono variare sia per il diverso background genico della popolazione esaminata, sia per la complessità della malattia e della risposta immunitaria. Uno studio, mediante l'utilizzo dei microarray, ha determinato le differenze dei profili trascrizionali, dopo stimolazione dei linfociti T con PPD, tra i pazienti con malattia attiva e individui con infezione latente. I risultati ottenuti indicano che la combinazione di tre distinti geni (CXCL10, ATP10A e TLR6), associati ai differenti stati dell'infezione tubercolare, possono essere usati come markers nel discriminare tra malattia attiva e infezione tubercolare latente, gettando nuova luce sulla risposta immunitaria dell'uomo a *Mtb* (Lu et al., 2011). L'infezione tubercolare latente è associata ad uno stato di latenza del patogeno e diversi antigeni legati a questo stato o alla riattivazione del micobatterio possono rappresentare potenziali markers diagnostici di infezione tubercolare latente. Alcuni di questi antigeni sono stati ampiamente testati attraverso il rilascio di IFN- γ e si è visto che sono differentemente

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

riconosciuti nei soggetti non infetti, negli individui con LTBI e nei pazienti con TB attiva (Black et al., 2009; Goletti et al., 2010, Commandeur et al., 2013). Uno studio ha valutato la risposta dell'IFN- γ dopo stimolazione con 60 differenti antigeni, che vengono espressi sia nello stato di latenza che nella riattivazione della malattia. I risultati ottenuti hanno evidenziato che 16 dei 60 antigeni saggiati inducono una significativa più elevata produzione di IFN- γ negli individui con LTBI rispetto ai soggetti non infetti e ai pazienti con TB attiva, risultando essere dei potenziali candidati per nuovi metodi diagnostici di rilevazione dell'infezione tubercolare latente. In particolare la risposta T cellulare verso l'antigene Rv 1733 è stata rilevata nei soggetti con LTBI ma non nei pazienti con TB attiva. Tale antigene risulta essere, quindi, non solo un promettente biomarker di infezione latente ma anche un promettente antigene nella discriminazione tra individui con LTBI e pazienti con TB attiva (Serra-Vidal et al., 2014). Nonostante tutto, ancora oggi, non è stato sviluppato un test che sia in grado di discriminare tra malattia attiva e infezione tubercolare latente. Un test di questo tipo sarebbe un utile strumento diagnostico che garantirebbe un maggior controllo della diffusione della tubercolosi.

Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin (HBHA)

I micobatteri sono tra i più importanti patogeni responsabili di malattie infettive sia negli uomini che negli animali. *Mycobacterium tuberculosis* infetta oltre un terzo della popolazione mondiale, causando ogni anno circa 10 milioni di nuovi casi e 3 milioni di morti (Raviglione et al., 1995). La lebbra, il cui agente eziologico è *Mycobacterium leprae*, rimane ancora un importante problema sanitario nei paesi in via di sviluppo (Noordeen et al., 1992), mentre i membri del *Mycobacterium avium* complex sono i più frequenti patogeni opportunisti nei pazienti affetti da AIDS (Horsburgh CR, 1991). Inoltre, il recente ritorno della tubercolosi nei paesi industrializzati assieme all'insorgenza e diffusione di ceppi MDR-TB hanno messo in luce le difficoltà nel controllo delle infezioni micobatteriche. Malgrado l'importanza delle infezioni micobatteriche, i meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di tali infezioni sono ancora poco conosciuti. Uno dei primi e cruciali eventi in qualsiasi processo infettivo è l'adesione del microrganismo ai suoi tessuti target. I micobatteri hanno un elevato tropismo per i polmoni, e le interazioni del bacillo tubercolare con i macrofagi alveolari sono state ampiamente documentate. Tuttavia, adesine micobatteriche, che interagiscono con le cellule dell'epitelio cellulare o la matrice extracellulare possono avere un ruolo nell'infezione, dal momento che questi sono i primi tessuti dell'ospite che i micobatteri incontrano quando vengono trasmessi mediante aerosol. Più recentemente, è stato suggerito che l'adesione dei micobatteri alle cellule epiteliali e alla matrice extracellulare è strettamente collegata alla virulenza e alla disseminazione extracellulare del bacillo tubercolare (Pethe et al., 2001). Mentre il legame dei micobatteri ai macrofagi coinvolge i recettori del mannosio e recettori del complemento, l'adesione alle cellule epiteliali sembrano avvenire attraverso interazioni con i glicoconiugati solfatidi. Come descritto per altri batteri patogeni, virus e parassiti, *M. tuberculosis* e *M. bovis* esprimono sulla loro superficie una proteina che lega l'eparina, coinvolta nell'adesione alle cellule epiteliali. Per la sua capacità di agglutinare gli eritrociti di coniglio, questa proteina è stata definita Heparin-binding Hemagglutinin Adhesin (HBHA). L'HBHA è una glicoproteina di 28-kD che è capace di indurre anche

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

36

l'aggregazione dei micobatteri in colonie mediante l'iterazione batteri-batterio. L'emoagglutinazione, l'aggregazione micobatterica, così come l'adesione alle cellule epiteliali sono specificatamente inibite in presenza di anticorpi anti-HBHA (Menozzi et al., 1996). L'HBHA è prodotta anche da altri micobatteri patogeni come *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium*, ma non dai micobatteri non patogeni come *Mycobacterium smegmatis* (Pethe et al., 2001). La microscopia elettronica, mediante l'uso di anticorpi monoclonali anti-HBHA, ha rivelato che l'HBHA è una proteina di superficie e con un ruolo di adesione (Figura 10).

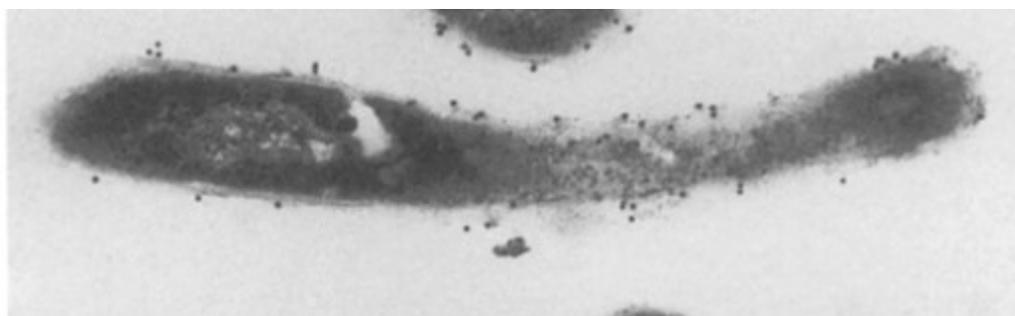


Figura 10: Fotografia al microscopio elettronico di *M. tuberculosis* H37 Ra. Gli anticorpi dopo incubazione con anticorpi anti-HBHA marcati. Da notare come la superficie del batterio è uniformemente marcata.

Analisi di Immunoblot hanno indicato, attraverso l'utilizzo di anticorpi antigene-specifici, che l'HBHA è diversa dalle proteine che legano la fibronectina dell'antigene 85 complex e p55, e il confronto della sequenza amminoacidica NH₂ terminale non mostra nessuna significativa similitudine con quella di altre proteine conosciute. La presenza dell'HBHA nei sieri di pazienti malati di TB, ma non in quelli di individui sani, è un indice dell'immunogenicità di questa adesina nell'uomo durante l'infezione tubercolare. La proteina nativa (nHBHA) è composta da due distinti domini (Delogu et Brennan, 1998): un dominio N-terminale, contenente una regione transmembrana idrofobica, una regione α -elica coiled-coil, e un dominio C-terminale caratterizzato dalla presenza di due sequenze ripetute ricche di lisina, chiamate R1 e R2. R1 (KKAAPA) è ripetuta tre volte tra gli aminoacidi 160 e 177, mentre R2 (KKAAAKK) è

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

ripetuta due volte tra gli aminoacidi 178 e 194, intervallata dalla sequenza APA. Una rimozione progressiva di tali ripetizioni in proteine ricombinanti espresse in *E.coli* ha mostrato un progressivo decremento nella costante di binding delle rHBHA. È stato dimostrato che una forma tronca della proteina priva del dominio C-terminale (rHBHA Δ C) è incapace di interagire con l'eparina (Pethe et al., 2000). L'HBHA presenta anche due importanti modifiche post-traduzionali: la glicosilazione e la metilazione. La glicosilazione è una caratteristica non molto comune nelle proteine di membrana batteriche, tuttavia è già stata osservata in particolari fattori di virulenza di altre specie batteriche, come ad esempio nelle proteine dei pili di *Neisseria gonorrhoeae*. È stato ipotizzato che la glicosilazione possa essere coinvolta nel meccanismo di secrezione dell'HBHA: essa infatti, pur essendo una proteina di membrana, non presenta alcun peptide segnale e di fatto è traslocata sulla membrana attraverso un meccanismo di secrezione alternativo ancora sconosciuto. La glicosilazione sembra avere anche un ruolo molto importante nel proteggere l'HBHA dall'attacco delle proteasi presenti nei fluidi biologici dell'ospite. Per questo motivo si suppone che la porzione oligosaccaridica sia collocata sul dominio C-terminale, il più suscettibile alla degradazione proteolitica perché ricco di lisine (Menozzi et al., 1998). La metilazione, catalizzata da metiltransferasi, che molto probabilmente sono localizzate nella parete micobatterica, è la seconda modifica post-traduzionale che caratterizza l'HBHA e riguarda le lisine del dominio C-terminale, che nella proteina nativa sono mono o di metilate (Pethe et al., 2002). Insieme alla glicosilazione, anche la metilazione svolge un ruolo importante nella protezione del dominio C-terminale dall'attacco delle proteasi. Dettagliate analisi biochimiche hanno indicato che l'HBHA nativa contiene 20-26 gruppi metilici sui residui 159-199. Questi gruppi metilici non sono presenti nella rHBHA prodotta da *E.coli*. È stato mostrato che specifici anticorpi sono in grado di riconoscere l'HBHA ma non la proteina ricombinante, suggerendo la possibilità che le modifiche post-traduzionali facciano parte dell'epitopo riconosciuto da tali anticorpi. In particolare è stato osservato che metilando enzimaticamente la proteina ricombinante rHBHA, alcuni anticorpi sono ugualmente in grado di riconoscere la proteina (Pethe et al., 2002). Ciò proverebbe che la metilazione conferisce importanti

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

proprietà immunogeniche alla proteina. Esperimenti in vivo hanno dimostrato che l'HBHA è coinvolta nella disseminazione extrapolmonare di *Mtb* (Pethe et al., 2001). È stato dimostrato che l'introduzione di una mutazione nel gene che codifica l'HBHA in *M. tuberculosis* o in *M. bovis* BCG altera fortemente le interazioni tra *Mtb* e le cellule epiteliali. Quando questi ceppi mutati sono stati inoculati per via nasale in topi, si è osservata una compromissione della colonizzazione della milza ma non di quella del polmone. Questi risultati forniscono la prova che l'HBHA è necessaria per la diffusione extrapolmonare e che le interazioni con le cellule non fagocitiche hanno un ruolo importante nella patogenesi della tubercolosi. Per determinare l'immunogenicità dell'HBHA, sono stati condotti numerosi studi che hanno determinato sia la risposta T cellulare, mediante il rilevamento dell'IFN- γ , sia la risposta umorale in pazienti con TB attiva, in individui con infezione tubercolare latente e in soggetti sani. Temmerman et al., in un lavoro pubblicato nel 2004, per determinare il ruolo della metilazione dell'HBHA, hanno rilevato la risposta delle cellule T in individui con infezione tubercolare latente e in pazienti con TB attiva, dopo stimolazione con entrambe le forme di HBHA: nHBHA e rHBHA. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'HBHA nativa induce elevati livelli di IFN- γ negli individui LTBI rispetto ai soggetti TB, dove la risposta è quasi nulla; suggerendo che l'HBHA è un antigene di latenza associata allo stato di LTBI. Inoltre si è visto che, nei soggetti con LTBI, la forma nativa dell'HBHA determina maggiori livelli di IFN- γ rispetto alla forma ricombinante, suggerendo che la metilazione è importante per la produzione di IFN- γ in questi individui. La differente produzione di IFN- γ è dovuta al fatto che la maggior parte degli individui con LTBI riconoscono epitopi T cellulari che sono presenti nella forma nativa ma assenti nella forma ricombinante. Sia la forma nativa che la forma ricombinante stimolano la produzione di IFN- γ da parte dei linfociti CD4 e CD8. Gli individui che rispondono ad entrambe le forme non riconoscono gli stessi epitopi di quelli che vengono riconosciuti solo dalla forma nativa, indicando che differenti popolazioni T cellulari sono attivate dall'esposizione ai due antigeni. Queste popolazioni differiscono più per la specificità dei loro epitopi che per il loro fenotipo, e questo può essere rilevante per il meccanismo di protezione perché suggerisce che, entro lo stesso antigene, alcuni epitopi possono

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

essere protettivi mentre altri no. Masungi et., nel 2004, hanno determinato la risposta T cellulare HBHA-specifica di 25 individui sani infetti e di 24 pazienti con TB attiva. I risultati di questo lavoro hanno dimostrato che il 60% degli individui infetti producono alti livelli di IFN- γ in risposta alla stimolazione in vitro con HBHA. Al contrario, solo il 4% dei pazienti con TB attiva secerne elevati livelli di IFN- γ . Inoltre, si è visto che i soggetti con TB attiva producono nuovamente IFN- γ HBHA-specifico dopo trattamento con i farmaci antitubercolari. Queste osservazioni indicano che i soggetti con TB attiva non hanno un difetto intrinseco nella loro capacità di dare una risposta T cellulare contro l'HBHA; piuttosto, questa risposta, durante la malattia, risulta essere soppressa, suggerendo che meccanismi di regolazione svolgono un ruolo importante nell'evasione immunitaria di *Mtb*. In un lavoro di Hougardy et al. del 2007, è stato dimostrato che la bassa produzione di IFN- γ -HBHA specifica nei pazienti con TB attiva è determinata dalla soppressione da parte dei linfociti Treg circolanti. Tuttavia, i livelli relativamente bassi nel numero delle cellule T che secernono IFN- γ -HBHA specifico nei soggetti con TB non possono essere solo determinati dalla soppressione da parte delle cellule Treg. È anche possibile che durante la malattia attiva, i linfociti T che secernono IFN- γ -HBHA specifico siano reclutati al sito di infezione e pertanto risultano essere presenti in basso numero nel sangue periferico. Place et al., in lavoro del 2010, hanno valutato se l'HBHA induce una risposta IFN- γ specifica direttamente nel sito di malattia. In questo lavoro è stata determinata la risposta IFN- γ su sangue periferico, broncolavaggio e liquido pleurico in pazienti con TB polmonare e pleurica. I risultati ottenuti hanno dimostrato che a livello polmonare e pleurico vi è un'elevata risposta IFN- γ -HBHA specifica prodotta sia dai linfociti T CD4 che da quelli CD8, e che questa risposta non viene soppressa dalle cellule Treg, in contrasto con i dati precedentemente riportati sui linfociti circolanti. Pertanto, i pazienti con TB attiva mostrano differenti risposte effettrici e regolatrici verso l'HBHA a livello locale e circolatorio. A livello locale vi è una predominante risposta delle cellule T CD4 e CD8, mentre a livello circolatorio predomina una risposta delle cellule Treg. Masungi et al, hanno dimostrato anche che, in contrasto con la ridotta capacità dei pazienti con TB attiva di produrre IFN- γ HBHA-specifico, l'82% di questi ha prodotto anticorpi anti-HBHA, rispetto al 36% dei soggetti

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

infetti. Questa correlazione negativa tra produzione di anticorpi e risposta T cellulare è stata riportata anche per altri antigeni micobatterici. Questi risultati possono essere utili per la progettazione di nuovi vaccini contro la tubercolosi ed inoltre il rilevamento di cellule T HBHA specifiche nel sito di infezione può essere un promettente strumento per la diagnosi di malattia attiva. In un altro lavoro di Shin et al., del 2006, è stato osservato che la proteina reagisce debolmente con le Ig G del siero dei pazienti affetti da TB, mentre reagisce molto fortemente con le Ig M che sono quelle espresse durante le prime fasi di infezione del batterio. Ciò suggerisce che l'HBHA possa avere un ruolo importante nell'indurre la produzione di anticorpi nella prima fase di infezione e che tali anticorpi siano quelli in grado di arginare l'infezione. La purificazione dell'HBHA da ceppi di *M. tuberculosis* o da ceppi di *M. bovis* BCG, utilizzata per tutti gli studi immunologici atti a determinare la sua immunogenicità, risulta essere una procedura complessa e richiede tempi molto lunghi data la lenta crescita del bacillo tubercolare. Dal momento che l'HBHA ricombinante espressa in *E. coli* non è metilata, lo sviluppo di una nuova strategia che renda meno complessa la procedura di estrazione e che riduca di tempi di ottenimento della proteina, potrebbe accelerare gli sforzi per testare l'efficacia dell'HBHA come un possibile candidato per la costruzione di nuovi vaccini o come componente per nuovi test impiegati nella diagnosi dell'infezione tubercolare. Delogu et al., in un lavoro del 2004, hanno costruito un ceppo di *M. smegmatis* ricombinante (pMV3-38) che esprime HBHA metilata histidine-tagged (rHBHAm) che può essere facilmente purificata. L'uso di ceppi di *M. smegmatis* a rapida crescita ha permesso di ottenere grandi quantità di HBHA purificata in tempi molto brevi. Attraverso analisi di spettrometria di massa, si è osservato che il pattern di metilazione della rHBHAm è simile a quello della nHBHA (rHBHAm contiene 16 gruppi metilici contro i 23 gruppi metilici presenti nella nHBHA), e questa parziale metilazione è sufficiente a salvaguardare le proprietà immunologiche dell'HBHA come dimostrato da studi sulla risposta umorale indotta dalla rHBHAm-specifica. Zanetti et al., in un lavoro del 2005, hanno determinato la risposta umorale verso diversi antigeni micobatterici (PE_PGRS33, PPE44, Ag85B, rHBHA e rHBHAm) in tre differenti gruppi: pazienti con TB attiva, individui con LTBI e soggetti sani. I risultati ottenuti

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

hanno indicato che la risposta anticorpale contro gli antigeni PE_PGRS33, PPE44 e Ag85B non è significativamente diversa tra i tre gruppi testati. Al contrario, la risposta umorale verso la rHBHA e la rHBHAm è significativamente più elevata nei pazienti TB rispetto agli altri due gruppi, indicando che la rHBHAm può essere un buon candidato per lo sviluppo di nuovi test diagnostici volti ad identificare i soggetti affetti da tale malattia. Delogu et al., in lavoro del 2011, hanno valutato la risposta T cellulare, sia a breve che a lungo termine, verso la rHBHAm in individui con differenti stati della TB, risultati positivi al QuantiFERON-TB Gold mediante ELISA e citofluorimetria. In questo lavoro è stato determinato che la risposta IFN- γ -rHBHAm specifica è mediata dai linfociti T CD4 e che, sia a breve che a lungo termine, è significativamente più bassa nei pazienti con TB attiva rispetto agli individui con LTBI e ai soggetti con TB pregressa. I dati ottenuti hanno indicato che, come per l'HBHA nativa, anche per la forma ricombinante e metilata dell'HBHA prodotta in *M. smegmatis* l'elevata risposta di IFN- γ è associata con lo stato di infezione e non con quello di malattia. I risultati di questo studio sono di rilevante importanza, in quanto hanno permesso di identificare, combinando il risultato del QFT-IT con il risultato della rHBHAm, un potenziale approccio immunologico che, in due fasi, permette di identificare i soggetti con differenti stati della tubercolosi. Infatti, gli individui che rispondono ad entrambi i test, sono i soggetti in grado di controllare la replicazione di *Mtb* (come quelli con passata o recente infezione o quelli con TB pregressa), mentre i soggetti che rispondono solo al QFT-IT sono quelli che presentano malattia attiva. Pertanto, da tutti questi studi si evince che i saggi basati sul rilascio di IFN- γ , in risposta sia all'HBHA nativa che all'HBHA ricombinante metilata prodotta da *M. smegmatis*, sono per il momento gli unici potenziali mezzi diagnostici in grado di discriminare i pazienti con TB attiva dai soggetti con infezione tubercolare latente e anche di aumentare, associandoli ai saggi IGRA RD1-specifici, la loro sensibilità e specificità (Hougardy et al., 2007). Tuttavia, dal momento che l'HBHA è presente in altri micobatteri compreso il *M. bovis* BCG, e di conseguenza risposte IFN- γ positive sono state trovate anche nei soggetti vaccinati (Savolainem et al., 2008), la specificità dei test basati sull'HBHA deve essere ancora determinata.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

Scopo della tesi

Una sfida importante nel controllo della tubercolosi sarebbe quello di sviluppare un vaccino che sia più efficace del BCG o nuovi sistemi diagnostici che siano in grado di distinguere in modo rapido e specifico gli individui che riescono a controllare la replicazione di *Mtb* (soggetti con remota infezione tubercolare, soggetti con recente infezione tubercolare e pazienti con pregressa TB attiva) da quelli che invece non lo sono (pazienti con TB attiva). Questa discriminazione sarebbe molto utile perché consentirebbe di individuare coloro che necessitano di una tempestiva terapia, evitando pertanto la diffusione dell'infezione nella collettività. Il più diffuso strumento usato da circa 100 anni per individuare i soggetti che sono venuti a contatto con il bacillo tubercolare è il test cutaneo della tubercolina (TST). Il TST rileva la reazione di ipersensibilità di tipo ritardato prodotta in risposta all'inoculo di un derivato proteico purificato (PPD) in soggetti venuti a contatto con il bacillo tubercolare. Nonostante sia il test universalmente riconosciuto per la diagnosi di infezione tubercolare latente presenta dei limiti. È, infatti, un saggio poco specifico a causa della cross-reattività antigenica esistente tra PPD, micobatteri non tubercolari e BCG, responsabile di una certa quota di falsi positivi; è poco sensibile soprattutto in alcune categorie di individui, come soggetti immunodepressi o soggetti in trattamento con farmaci immunosoppressivi, in cui il TST può dare un risultato falsamente negativo. Inoltre, essendo un test in vivo, necessita di una visita di controllo per la lettura del risultato, e sia l'inoculo che la lettura sono operatore-dipendente ed entrambe dimostrano una notevole variabilità. Inoltre un altro limite del TST è che non discrimina tra infezione latente e malattia attiva. Malgrado tutti i suoi limiti il TST è rimasto nell'uso clinico per molti anni in quanto non si è riusciti a trovare un valido test alternativo per la diagnosi di LTBI. A causa dei limiti del TST, negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi test diagnostici che hanno aumentato la sensibilità e specificità dell'infezione tubercolare e che sono stati riconosciuti a livello internazionale come validi strumenti per la diagnosi dell'infezione tubercolare. I test disponibili in commercio sono il QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFN-GT) e il T-SPOT. TB (T-SPOT). Questi test rilevano la produzione

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

di IFN- γ (quantità di IFN- γ o numero di linfociti T produttori di IFN- γ) in seguito a stimolazione con tre antigeni *Mtb*-specifici: ESAT-6, CFP-10 e TB7.7. Queste proteine sono codificate da geni localizzati all'interno delle regioni genomiche RD1 e RD11, e risultano essere, pertanto, più specifiche del PPD poiché mancano nel ceppo BCG e in molti altri micobatteri non tubercolari, con poche eccezioni. Sebbene questi saggi siano specifici e forniscano un'accurata diagnosi di infezione tubercolare, non discriminano tra soggetti con infezione latente da quelli con malattia attiva e tra gli individui con infezione tubercolare latente, quelli con infezione pregressa da quelli con infezione recente. Pertanto, un possibile contributo nel distinguere queste due fasi della tubercolosi potrebbe consistere in una più precisa definizione della risposta immunitaria dell'uomo a *Mtb*, per capire quali suoi componenti o quali antigeni tubercolari siano in grado di differenziare questi due stati dell'infezione tubercolare. Mentre ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 sono proteine che vengono secrete durante la fase attiva di *Mtb*, diversi antigeni micobatterici sono noti per essere associati con la fase latente dell'infezione, rappresentando potenziali biomarker per la diagnosi della LTBI. Un antigene micobatterico che sembra discriminare tra TB attiva e LTBI è l'Heparin-Binding Hemagglutinin (HBHA), un'adesina di *Mtb*. Tutti gli studi effettuati per determinare la risposta cellulare dell'uomo verso quest'adesina hanno utilizzato la forma nativa purificata da *Mtb* H37Ra o da *M. bovis* BCG. Dal momento che la purificazione della forma nativa dell'HBHA è una procedura complessa e richiede tempi molto lunghi data la lenta crescita del bacillo tubercolare, Delogu et al., hanno costruito un ceppo di *M. smegmatis* ricombinante che esprime HBHA metilata histidine-tagged (rHBHAm) immunologicamente attiva come quella nativa. Lo sviluppo di questo ceppo di *M. smegmatis* ricombinante ha permesso di ottenere, in tempi molto brevi, grandi quantità di questa proteina. Considerando i dati presenti in letteratura che indicano come la TB attiva sia associata ad una maggiore produzione di TNF- α , mentre la LTBI sia caratterizzata da una maggiore produzione di IFN- γ e IL-2, ed inoltre che l'adesina HBHA possa essere un potenziale antigene da utilizzare nell'identificazione dei soggetti con TB attiva; lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la produzione di TNF- α e IL-2, oltre quella dell'IFN- γ , dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 e

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

HBHA per determinare se siano in grado di discriminare tra infezione latente e malattia attiva. In questo lavoro la produzione di queste tre citochine è stata determinata mediante ELISA e citofluorimetria in tre gruppi di soggetti: pazienti con TB attiva, individui con infezione latente e soggetti sani. L'utilizzo della citofluorimetria ha permesso di testare, oltre a queste tre citochine, anche altre citochine coinvolte nella patogenesi e nel controllo dell'infezione tubercolare, come IL-17, IL-10, IL-6, IL-4. Inoltre, dal momento che numerosi studi indicano che l'IFN- γ e l'IL-2 sono associati con diversi stati clinici e carica antigenica in diverse infezioni virali e batteriche, si è voluto determinare la produzione di queste citochine anche dopo 72 ore di stimolazione in vitro con gli antigeni RD1/RD11.

Materiali e metodi

In questo lavoro sono stati analizzati 88 pazienti, a cui è stato effettuato il test cutaneo della tubercolina, suddivisi nei seguenti tre gruppi:

- Gruppo TB: in questo gruppo sono stati compresi 13 pazienti affetti da malattia attiva. In tutti questi pazienti la diagnosi di TB è stata effettuata mediante le tradizionali tecniche microbiologiche: esame microscopico, esame colturale MGIT 960 e Lowestein-Jensen, esame molecolare. Tutti i soggetti, tranne uno, presentavano un TST positivo.
- Gruppo LTBI: in questo gruppo sono stati compresi 37 individui con infezione tubercolare latente, nei quali la diagnosi di infezione è stata fatta mediante un esito negativo all'esame microbiologico. Tutti gli individui presentavano un TST positivo e avevano riferito di aver avuto un contatto con pazienti con TB attiva.
- Gruppo di controllo (HC): in questo gruppo sono stati compresi 38 individui sani, che presentavano negatività sia al TST che all'esame colturale e senza nessun contatto con pazienti affetti da malattia attiva.

Ad ogni individuo è stato prelevato 1 ml di sangue per eseguire i saggi di stimolazione linfocitaria in vitro, sia con gli antigeni del QFT-IT che con l'HBHA ricombinante espressa in *Mycobacterium smegmatis*. Dopo 24 ore di incubazione, a 37°C in termostato, da ciascun campione di sangue sono stati prelevati circa 500 µl di plasma. Mediante saggio immunoenzimatico ELISA è stata determinata la produzione delle citochine IFN- γ , TNF- α e IL-2 derivante dalla stimolazione con entrambi gli antigeni. Per le citochine IFN- γ e IL-2 è stato effettuato un altro test ELISA dopo 72 ore di stimolazione con gli antigeni RD1 e RD11. Inoltre, sia le tre citochine sopra citate sia le citochine IL-17, IL-8, IL-6 e IL-4 sono state determinate mediante citofluorimetria dopo stimolazione con gli antigeni RD1/RD11.

Determinazione del TST.

Il TST è stato effettuato da personale addetto secondo il protocollo standard internazionale: 5 UI di Derivato Proteico Purificato (PPD) sono state iniettate per via intradermica con lettura del risultato dopo 42-72 ore dall'inoculo e misura in millimetri del diametro dell'indurimento. Il TST è stato definito negativo se l'indurimento rilevato è risultato assente o inferiore ai 5 millimetri, viceversa è stato definito positivo se l'indurimento rilevato è risultato maggiore o uguale ai 5 millimetri.

Determinazione dell'IFN- γ mediante ELISA.

La quantità di IFN- γ è stata determinata dopo 24 h e 72 h di stimolazione linfocitaria in vitro con gli antigeni del QFT-IT e solo dopo 24 h con l'HBHA ricombinante sui campioni ematici raccolti. Per quanto riguarda la stimolazione effettuata con gli antigeni RD1/RD11 sono state seguite le indicazioni della casa produttrice del QFT-IT (Cellestis, Australia). 1 ml di sangue è stato dispensato nelle tre provette del QFT-IT: Mitogeno (fitoemoagglutinina A: controllo positivo), Antigeni *Mtb*-specifici (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7) e un controllo negativo (senza mitogeno, né antigene). Successivamente, le provette sono state agitate accuratamente per garantire il mescolamento del campione ematico con il loro contenuto e dopo sono state messe ad incubare overnight in termostato a 37°C. Successivamente è stata prelevata un'aliquota di plasma per la determinazione, mediante ELISA, dell' IFN- γ prodotto. In breve, in ciascun pozzetto della micropiastra sono stati dispensati 50 μ l di coniugato. Di seguito sono stati aggiunti 50 μ l di plasma e di IFN- γ standard. Dopo due ore di incubazione a temperatura ambiente, in ogni pozzetto della piastra sono stati aggiunti, per 6 volte, 300 μ l di soluzione di lavaggio. Dopo il lavaggio sono stati dispensati 100 μ l di substrato enzimatico e la piastra è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente. Concluso il tempo di incubazione è stata aggiunta la soluzione di arresto della reazione enzimatica nella quantità di 50 μ l per pozzetto. L'assorbanza è stata letta a 450 nm con un filtro di

riferimento da 650 nm utilizzando il VERSA Tunable Max microplate reader (Molecular Devices). È stato utilizzato un software, fornito dal kit, che, combinando tra loro i valori delle tre aliquote di plasma testate per ciascun soggetto ha permesso un calcolo dei risultati sia qualitativi che quantitativi. I risultati sono stati interpretati in accordo con le indicazioni della casa produttrice e sono espressi in unità internazionali (IU/ml). Il valore di cut-off di IFN- γ è pari a 0.35 IU/ml. Un valore di IFN- γ \geq 0.35 IU/ml è considerato positivo, mentre un valore $<$ 0.35 IU/ml è considerato negativo. Nella circostanza di concentrazioni di IFN- γ nel controllo negativo \geq 8 IU/ml e/o la differenza tra mitogeno e controllo negativo è $<$ 0.5 IU/ml, il risultato è considerato indeterminato. In parallelo con il QFT-IT, 1 ml di sangue eparinato è stato stimolato con 2 μ g/ml di HBHA ricombinante. La produzione di IFN- γ -HBHA specifica è stata determinata mediante ELISA e come cut-off di IFN- γ è stato stabilito 0.23 IU/ml.

Determinazione del TNF- α e dell'IL-2 mediante ELISA.

I campioni di plasma raccolti, dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 e con l'HBHA, sono stati impiegati per determinare la concentrazione di TNF- α (incubazione overnight) e di IL-2 (incubazione overnight e alle 72 h). La tecnica ELISA è stata effettuata secondo quanto indicato dai kit (Sigma-Aldrich. Human TNF- α e Human IL-2 ELISA Kit). Nella piastra ELISA sono stati dispensati 100 μ l di ciascun standard e 100 μ l di plasma. Dopo due ore di incubazione sono stati eseguiti quattro lavaggi con la soluzione di lavaggio e successivamente in ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di Biotinylated Detection Antibody. Dopo 1 ora di incubazione sono stati ripetuti i lavaggi e quindi sono stati aggiunti 100 μ l di HRP-Streptavidin solution. L'incubazione è stata effettuata per 45 minuti, dopo i quali sono stati eseguiti 4 cicli di lavaggi. In seguito sono stati aggiunti 100 μ l di ELISA Colorimetric TMB Reagent e dopo 30 minuti di incubazione al buio, sono stati aggiunti 50 μ l di Stop Solution. La lettura è stata effettuata a 450 nm utilizzando il VERSA Tunable Max microplate reader (Molecular Devices). Il cut-off di TNF- α derivante dalla stimolazione con gli antigeni RD1/RD11 è

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

stato di 0.24 IU/ml, quello derivante dalla stimolazione con l'HBHA è stato di 1.0 IU/ml. Il cut-off di IL-2 è stato di 0.11 IU/ml dopo 24 h di stimolazione e di 1.0 IU/ml dopo 72 h; mentre il cut-off di IL-2-HBHA specifico è stato di 0.1 IU/ml

Determinazione di citochine mediante citofluorimetria a flusso.

I campioni di plasma raccolti, dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11, sono stati diluiti (1/10) con l'appropriato diluente e utilizzati per il rilevamento simultaneo di sette citochine (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) mediante l'Human Th1/Th2/Th17 cytokine kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). La tecnica CBA utilizza biglie marcate a cui sono legati in modo covalente gli anticorpi specifici per le citochine. La massima emissione di cattura delle biglie è a 650 nm sul canale del rosso. Gli anticorpi citochina-specifici sono marcati con ficoeritrina (PE), che emette a 585 nm sul canale del giallo. L'intensità di fluorescenza del canale del giallo è proporzionale alla quantità di citochine presenti nel campione. Le citochine sono state determinate seguendo le indicazioni della casa produttrice. In breve, 50 μ l di campione e di PE detection antibody sono stati incubati con 50 μ l di capture bead reagent per 3 h a temperatura ambiente, al riparo della luce. Per rimuovere gli anticorpi non legati, a ciascun campione è stato aggiunto 1 ml di wash buffer, e dopo aver centrifugato per 5 minuti a 200 g, il surnatante è stato eliminato. Sono stati aggiunti 300 μ l di wash buffer per risospingere il pellet di biglie, prima dell'acquisizione al BD C6 Flow Citofluorimetro e, in seguito, l'analisi dei dati è stata effettuata mediante il BD FCAP Array software. I livelli delle citochine sono stati espressi in pg/ml e poi convertiti in IU/ml per facilitare il loro confronto con i livelli determinati mediante ELISA. 1 IU/ml corrisponde a 50 pg/ml (NIBSC, potters Bar, UK).

Analisi statistica.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il GraphPad Prism 6 software (GraphPad, San Diego, USA). I test statistici usati sono stati, il Fisher exact test per determinare le differenze delle risposte positive, il test Kruskal-Wallis e il test Mann-Whitney per determinare le differenze nei livelli di citochine prodotte tra i gruppi. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. L'accuratezza diagnostica dei test è stata determinata mediante la costruzione della curva ROC (receiving operating characteristic curve) e il calcolo dell'area sottesa ad essa (AUC, Area under the ROC curve). I valori di cut-off sono stati stimati a diverse sensibilità e specificità e determinati mediante l'indice J di Youden (sensibilità + specificità - 1).

L'HBHA, usata in questo lavoro, è stata purificata da un ceppo ricombinante di *Mycobacterium smegmatis* costruito come descritto nel lavoro di Delogu et al. del 2004.

Trasformazione ed isolamento di ceppi ricombinanti di *M. smegmatis*.

La preparazione delle cellule competenti di *M. smegmatis* e le procedure di elettroporazione sono state eseguite secondo le procedure standard. Il ceppo di *M. smegmatis* mc²155 è stato fatto crescere in terreno 7H9 addizionato con 10% di ADC (Microbiol, Cagliari, Italia) e con 0.05% di Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) (7H9/ADC/Tw) fino alla fase medio-logaritmica di crescita. Le cellule sono state poi raccolte e lavate due volte con glicerolo freddo al 10% e risospese nello stesso buffer. 0.2 ml di cellule competenti sono state elettroporate secondo le seguenti indicazioni: 1.5kV, 1000 Ohm, 25 μ F utilizzando l'apparecchio Gene Pulser (Biorad). Le cellule sono state raccolte e inoculate in 1 ml di terreno 7H9/ADC/Tw, incubate per 4 ore a 37°C in agitazione, e differenti diluizioni della coltura sono state seminate in piastre di 7H11 contenente OADC e 50 μ g/ml di igromicina (Sigma-Aldrich). Le piastre sono state incubate a 37°C per 3-4 giorni per ottenere i ceppi ricombinanti.

Purificazione dell'HBHA-his tagged ricombinante dal ceppo di *M. smegmatis*.

Il ceppo ricombinante di *M. smegmatis* (pMV3-38) esprime l'HBHA histidine-tagged è stato fatto crescere in 200 ml di terreno Sauton contenente 50 µg/ml di igromicina per 4 giorni a 37°C in agitazione. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione e il pellet è stato lavato due volte in PBS freddo (Phosphate buffered saline). Le cellule sono state risospese in 20 ml di PBS contenente 0.05% di Tween 80, un inibitore delle proteasi P-8849 e 0.1 mg/ml di lisozima (Sigma-Aldrich) e incubate in ghiaccio per 15 minuti. Cinque cicli di sonicazione, ognuno di circa 3 minuti, sono stati effettuati per ottenere i lisati cellulari, utilizzando lo strumento Sonifier Cell Disruptor (Branson Sonic Power, Danbury Connecticut). Le cellule lisate sono state centrifugate a 1500g e il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta e poi miscelato con 8 ml della matrice Ni-NTA (X-Press, Invitrogen), precedentemente preparata come indicato dalla casa produttrice. Successivamente la matrice è stata incubata per 30 minuti a 4°C e lavata prima tre volte con 30 ml di NBB (500mM NaCl, NaHCO₃, NaH₂CO₂, pH 7.8), poi cinque volte con NWB (500mM NaCl, NaHCO₃, NaH₂CO₂, pH 6.0) e infine una sola volta con NWB contenente 50mM di imidazolo. La matrice Ni-NTA è stata poi trasferita nella colonna per essere eluita con NWB contenente concentrazioni crescenti di imidazolo (200, 350 e 500 mM). Le frazioni eluite sono state analizzate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) e il gel è stato poi colorato con blu Coomassie. Le frazioni contenenti la proteina purificata sono state unite e dializzate usando centrifugal filter devices (Amicon, Redford, MA). La concentrazione della proteina purificata è stata determinata mediante il metodo BCA.

Risultati

Determinazione di IFN- γ dopo stimolazione con gli antigeni RD1/RD11 mediante ELISA e citofluorimetria

I campioni di sangue prelevati dai soggetti appartenenti al gruppo TB attiva, LTBI e HC sono stati stimolati con gli antigeni RD1/RD11. Dopo 24 ore di stimolazione, la produzione di IFN- γ è stata determinata mediante citofluorimetria ed ELISA. Il valore di cut-off per il QFT-IT è di 0.35 IU/ml, mentre per la citofluorimetria è stato scelto 1.83 IU/ml come valore di cut-off. Non è stata trovata nessuna differenza significativa nella risposta positiva tra il gruppo TB e il gruppo LTBI ($P=0.2600$ ELISA, $P=0.0755$ citofluorimetria). Nel gruppo TB attiva è stata determinata una risposta positiva sia al QFT-IT che al citofluorimetro in 12 dei 13 pazienti. Nel gruppo LTBI, tutti i 37 soggetti sono risultati positivi al QFT, mentre al citofluorimetro solo 23 soggetti hanno avuto una risposta positiva. Nel gruppo HC, sia al QFT che al citofluorimetro, tutti i 38 soggetti hanno dato esito negativo (Tabella 3). L'analisi statistica effettuata ha mostrato una significativa differenza nella produzione media di IFN- γ tra il gruppo dei soggetti con infezione tubercolare (TB attiva e LTBI) e il gruppo dei soggetti senza infezione ($P<0.0001$) sia per l'ELISA che per la citofluorimetria. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata tra il gruppo TB e il gruppo LTBI ($P=0.0558$ ELISA e $P=0.8313$ citofluorimetria). Infatti, la quantità media di IFN- γ prodotta dal gruppo LTBI è stata di 5,8 IU/ml per il QFT, e di 15.0 IU/ml per il citofluorimetro; mentre quella registrata per il gruppo TB è stata rispettivamente 4.3 IU/ml e 14.4 IU/ml (Figura 11).

Gruppi (n = 88)	QFT			Citofluorimetria	
	IFN- γ (UI/ml)			IFN- γ (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Indeterminato	Positivo	Negativo
TB (n =13)	12	0	1	12	1
LTBI (n= 37)	37	0	0	23	14
HC (n= 38)	0	38	0	0	38

Tabella 3. Risultati ottenuti verso gli antigeni RD1-RD11 nei gruppi esaminati.

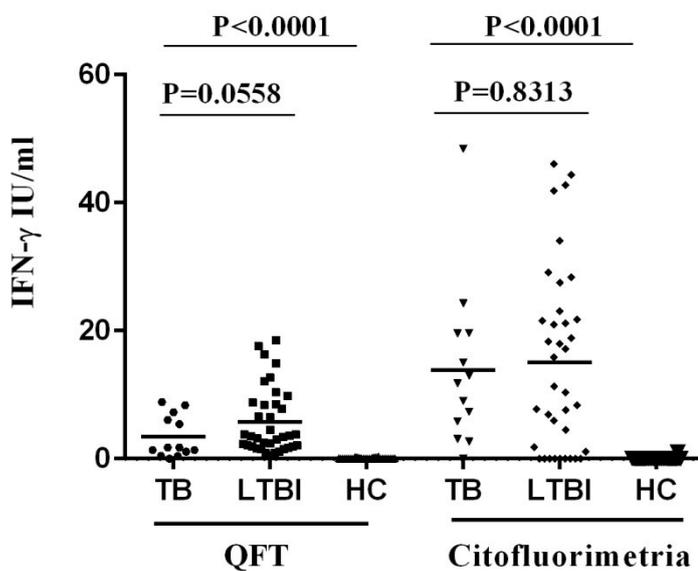


Figura 11. Confronto tra QFT e citofluorimetria nella produzione di IFN- γ dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11.

È stata determinata anche la produzione di TNF- α e IL-2 nei campioni di plasma precedentemente saggiati per l'IFN- γ .

Determinazione di TNF- α dopo stimolazione con gli antigeni RD1/RD11 mediante ELISA e Citofluorimetria

I valori di cut-off sono stati di 0.24 IU/ml per l'ELISA e 6.15 IU/ml per la citofluorimetria. Non c'è stata nessuna differenza significativa nella risposta positiva tra il gruppo TB e il gruppo LTBI (P=0.1792 ELISA, P=0.5152 citofluorimetria). Infatti, con l'ELISA, è stata riscontrata una risposta positiva in 11 dei 13 pazienti con TB attiva, mentre con la citofluorimetria 9 individui su 13 sono risultati positivi. Nel gruppo con LTBI, con l'ELISA, 23 dei 37 individui sono risultati positivi; mentre con la citofluorimetria solo 20 soggetti hanno dato esito positivo. Nel gruppo di controllo tutti i 38 soggetti sono risultati negativi sia all'ELISA che alla citofluorimetria (Tabella 4). L'analisi statistica ha mostrato una significativa differenza nella produzione di TNF- α tra il gruppo con infezione tubercolare (TB attiva e LTBI) e il gruppo di controllo (P<0.0001 ELISA e P=0.002 citofluorimetria). Non c'è stata, invece, nessuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo TB e il gruppo LTBI (P=0.1047 ELISA e P=0.2091 citofluorimetria). La produzione media di TNF- α è risultata essere, nel gruppo TB, di 7.67 IU/ml per la citofluorimetria e di 0,90 IU/ml per l'ELISA, quella prodotta dal gruppo LTBI è stata di 3.63 IU/ml per la citofluorimetria e di 0.61 IU/ml per l'ELISA (Figura 12).

Gruppi (n = 88)	ELISA		Citofluorimetria	
	TNF- α (UI/ml)		TNF- α (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
TB (n =13)	11	2	9	4
LTBI (n= 37)	23	14	20	17
HC (n= 38)	0	38	0	38

Tabella 4. Risultati ottenuti verso gli antigeni RD1-RD11 nei gruppi esaminati.

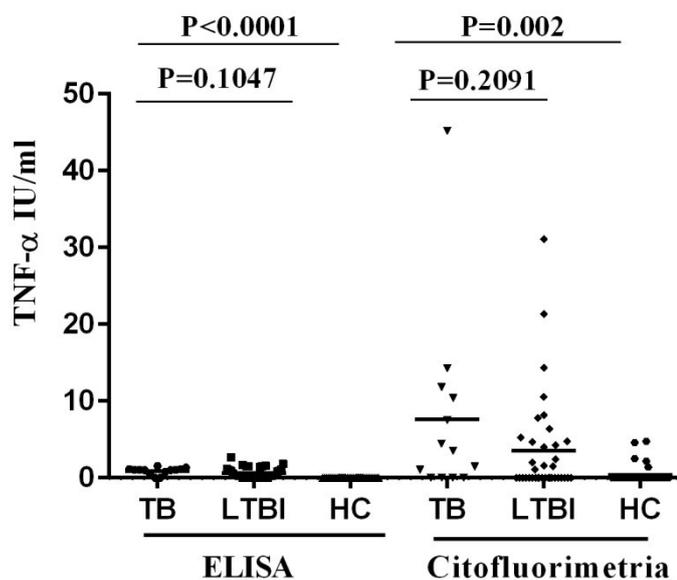


Figura 12. Confronto tra ELISA e citofluorimetria nella produzione di TNF- α dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11.

Determinazione di IL-2 dopo stimolazione con gli antigeni RD1/RD11 mediante ELISA e citofluorimetria

I valori di cut-off sono risultati essere rispettivamente di 0.11 IU/ml per l'ELISA e 1.6 IU/ml per la citofluorimetria. Non c'è stata nessuna differenza significativa nella risposta positiva tra il gruppo TB e il gruppo LTBI ($P=0.2476$ ELISA, $P=0.4992$ citofluorimetria). Infatti, nel gruppo con TB attiva si ha una risposta positiva in 12 soggetti, mentre con la citofluorimetria in 10 individui. Nel gruppo LTBI, con l'ELISA, 27 individui sono risultati positivi, mentre con la citofluorimetria 23 soggetti hanno dato un risultato positivo. Nel gruppo di controllo, sia con l'ELISA che con la citofluorimetria, non si ha nessun esito positivo (Tabella 5). L'analisi statistica ha mostrato una significativa differenza nella produzione di questa citochina tra il gruppo con infezione tubercolare (TB attiva e LTBI) e il gruppo di controllo ($P<0.0001$ ELISA e citofluorimetria). Non c'è stata, invece, nessuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo TB e il gruppo LTBI ($P=0.1997$ ELISA e $P=0.4659$ citofluorimetria) (Figura 13). Il livello medio di IL-2 prodotto è stato, nel gruppo con infezione latente, di 12.66 IU/ml per la citofluorimetria e di 1.37 IU/ml per l'ELISA; nel gruppo con malattia attiva è risultato essere di 5.51 IU/ml per la citofluorimetria e di 0.44 IU/ml per l'ELISA.

Gruppi (n = 88)	ELISA		Citofluorimetria	
	IL-2 (UI/ml)		IL-2 (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
TB (n = 13)	12	1	10	34
LTBI (n= 37)	27	10	23	14
HC (n= 38)	0	38	0	38

Tabella 5. Risultati ottenuti verso gli antigeni RD1-RD11 nei gruppi esaminati.

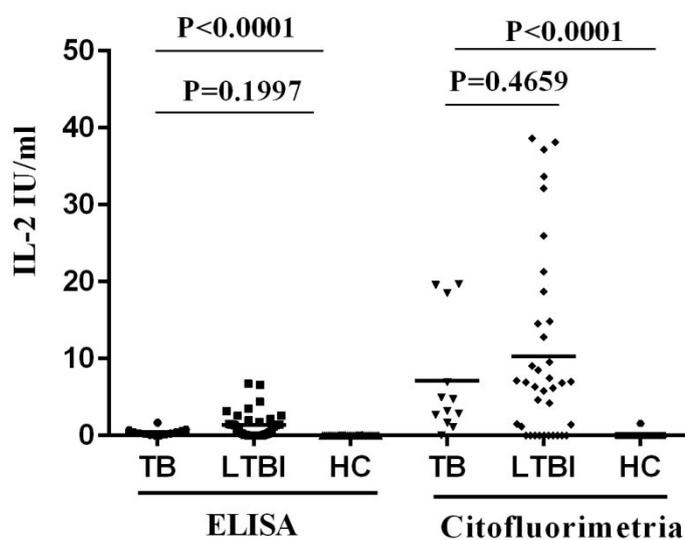


Figura 13. Confronto tra ELISA e citofluorimetria nella produzione di IL-2 dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11.

Determinazione di IL-17, IL-10, IL-6 e IL-4 dopo stimolazione con gli antigeni RD1/RD11 mediante citofluorimetria

Oltre che dell'IFN- γ , del TNF- α e dell'IL-2, mediante analisi citofluorimetrica, è stata determinata la produzione di altre citochine coinvolte nella protezione contro la tubercolosi: IL-17, IL-10, IL-6 e IL-4. L'analisi statistica non ha mostrato una significativa differenza nella produzione media di queste citochine tra il gruppo con infezione tubercolare (TB attiva e LTBI) e il gruppo controllo (Figura 14).

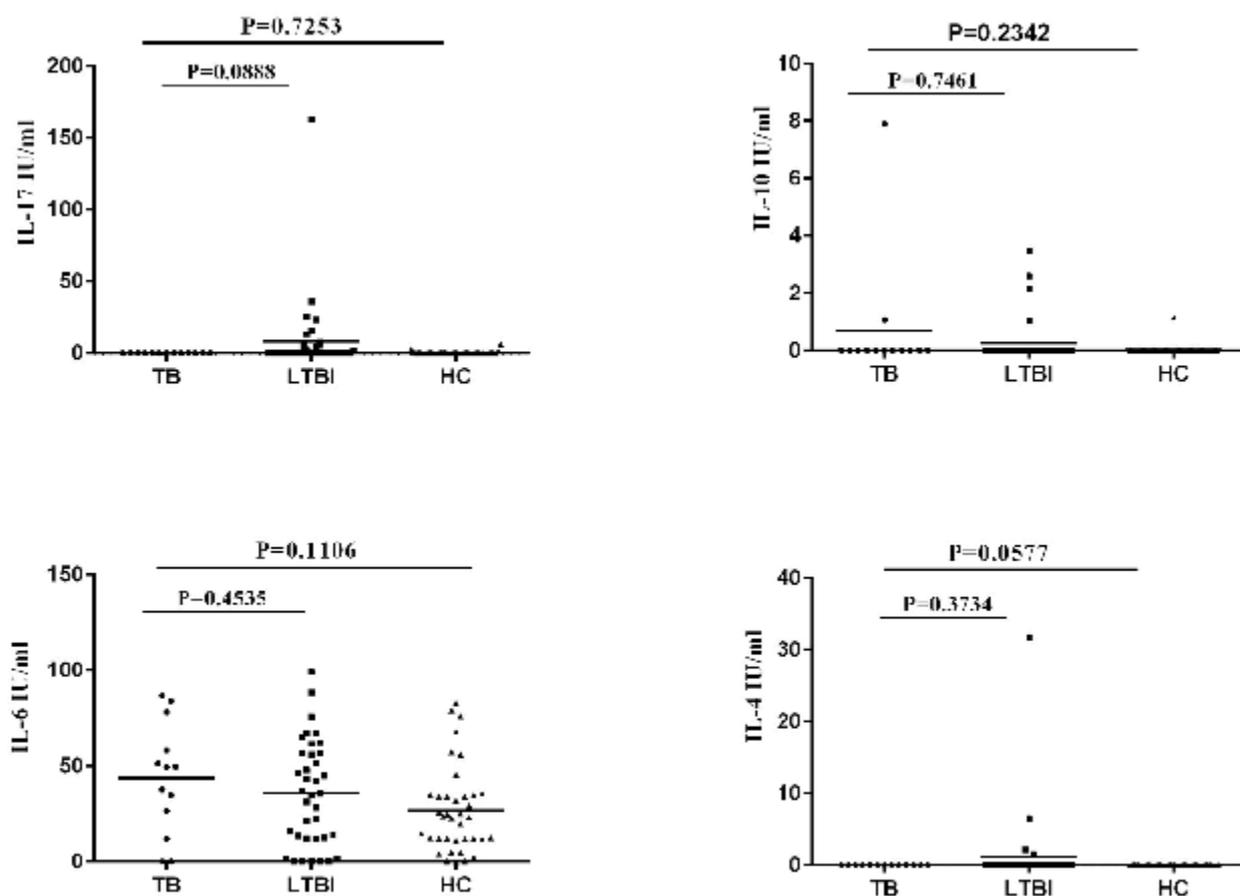


Figura 14. Produzione di IL-17, IL-10, IL-6 e IL-4 dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 mediante citofluorimetria.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

È stata determinata la produzione di IFN- γ , TNF- α e IL-2 dopo stimolazione con l'antigene rHBHAm, mettendola a confronto con quella ottenuta con gli antigeni RD1-RD11

Determinazione di IFN- γ dopo stimolazione con l'antigene rHBHAm.

Il valore di cut-off è stato di 0.23 IU/ml. L'analisi statistica ha dimostrato una differenza significativa nei livelli medi di questa citochina tra il gruppo degli individui con infezione tubercolare (TB attiva e LTBI) e il gruppo dei soggetti sani ($P < 0.0001$). In linea con altri lavori pubblicati, i livelli di IFN- γ sono stati bassi nei pazienti con malattia attiva rispetto a quelli dei soggetti con infezione latente. Infatti, nel gruppo TB la produzione media di IFN- γ è stata di 0.3 IU/ml, mentre quella del gruppo con LTBI è stata di 1.9 IU/ml, e dal punto di vista statistico questa differenza di produzione è significativa ($P < 0.0001$) (Figura 15). È stata dimostrata una significativa differenza nella risposta positiva all'rHBHAm tra il gruppo con malattia attiva e il gruppo con infezione latente ($P < 0.0001$). Infatti, nessun paziente con TB attiva è risultato essere positivo, mentre 30 dei 37 individui con LTBI mostra una risposta positiva ($P < 0.0001$). Tutti i soggetti, appartenenti al gruppo di controllo, sono risultati essere negativi (Tabella 6).

Gruppi (n = 88)	RD1-RD11			rHBHAmS	
	IFN- γ (UI/ml)			IFN- γ (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Indeterminato	Positivo	Negativo
TB (n =13)	12	0	1	0	13
LTBI (n= 37)	37	0	0	30	7
HC (n= 38)	0	38	0	0	38

Tabella 6. Risultati ottenuti verso RD1-RD11 e rHBHAmS nei gruppi esaminati.

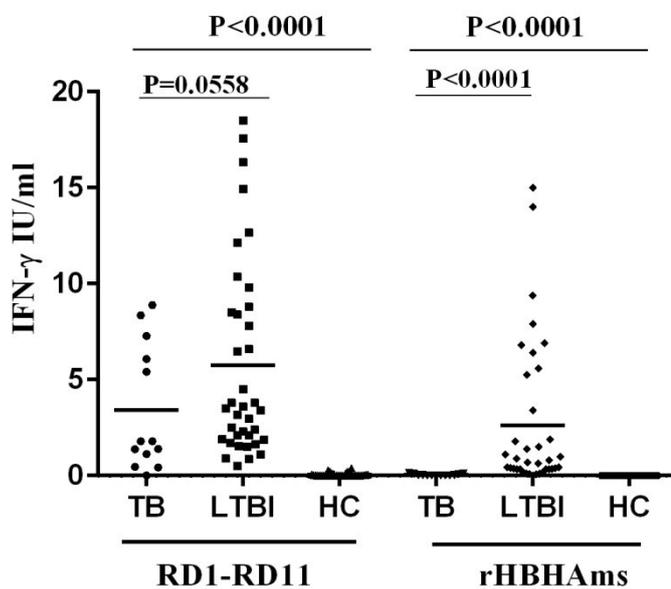


Figura 15. Confronto nella produzione di IFN- γ dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 e rHBHAmS.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

Determinazione TNF- α dopo stimolazione con l'antigene rHBHAmS.

Il valore di cut-off è stato di 1.0 IU/ml. L'analisi statistica ha dimostrato una differenza significativa nei livelli medi di questa citochina tra il gruppo degli individui con infezione tubercolare (TB attiva e LTBI) e il gruppo dei soggetti sani ($P < 0.0001$). In accordo con un precedente lavoro (Molicotti et al., 2011), nei pazienti con TB attiva sono stati registrati elevati valori di TNF- α rispetto a quelli osservati nel gruppo dei soggetti con LTBI. Infatti, la produzione media di TNF- α , nel gruppo TB, è stata di 10.31 IU/ml, mentre quella rilevata nel gruppo LTBI è stata di 3.24 IU/ml. È stata dimostrata una significativa differenza nella risposta positiva all'rHBHAmS tra il gruppo con malattia attiva e il gruppo con infezione latente ($P = 0.0380$) (Figura 16). Infatti, 12 dei 13 pazienti con TB sono risultati essere positivi, mentre 21 su 37 individui con LTBI ha dato risposta positiva. Tutti i 38 soggetti sani sono risultati essere negativi (Tabella 7).

Gruppi (n = 88)	RD1-RD11		rHBHAmS	
	TNF- α (UI/ml)		TNF- α (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
TB (n =13)	11	2	12	1
LTBI (n= 37)	23	14	21	16
HC (n= 38)	0	38	0	38

Tabella 7. Risultati ottenuti verso RD1-RD11 e rHBHAmS nei gruppi esaminati.

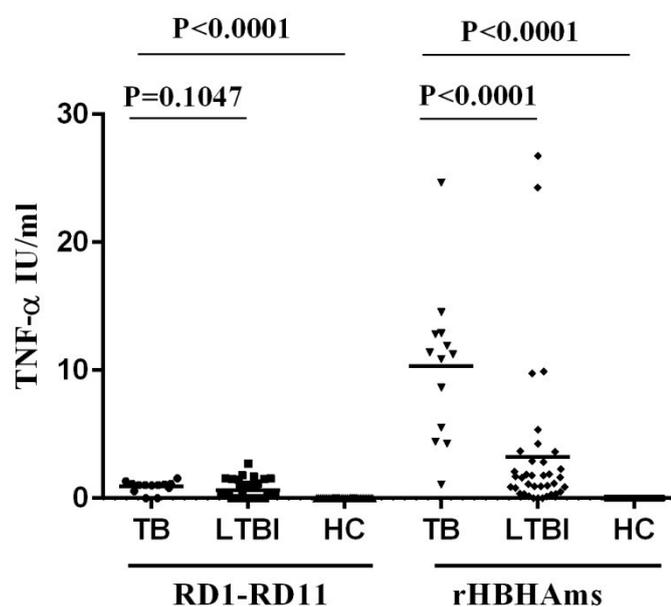


Figura 16. Confronto nella produzione di TNF- α dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 e rHBHAmS

Determinazione di IL-2 dopo stimolazione con l'antigene rHBHAmS.

Il valore di cut-off è stato di 0.14 IU/ml. L'analisi statistica ha dimostrato una differenza significativa nei livelli medi di questa citochina tra il gruppo degli individui con infezione tubercolare (TB attiva e LTBI) e il gruppo dei soggetti sani ($P < 0.0001$). Non c'è stata nessuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo TB e il gruppo LTBI ($P = 0.7801$) (Figura 17). Infatti, la produzione media di IL-2, nel gruppo LTBI, è stata di 1.0 IU/ml, mentre nel gruppo TB, è stata di 0.5 IU/ml. Non è stata dimostrata nessuna differenza significativa nella risposta positiva tra il gruppo TB e il gruppo LTBI ($P = 0.3266$). Infatti, 6 dei 13 pazienti TB sono risultati positivi, mentre nel gruppo LTBI 24 dei 37 individui LTBI hanno dato risposta positiva. Tutti i soggetti sani hanno dato risposta negativa (Tabella 8).

Gruppi (n = 88)	RD1-RD11		rHBHAmS	
	IL-2 (UI/ml)		IL-2 (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
TB (n = 13)	12	1	6	7
LTBI (n = 37)	27	10	24	13
HC (n = 38)	0	38	0	38

Tabella 8. Risultati ottenuti verso RD1-RD11 e rHBHAmS nei gruppi esaminati.

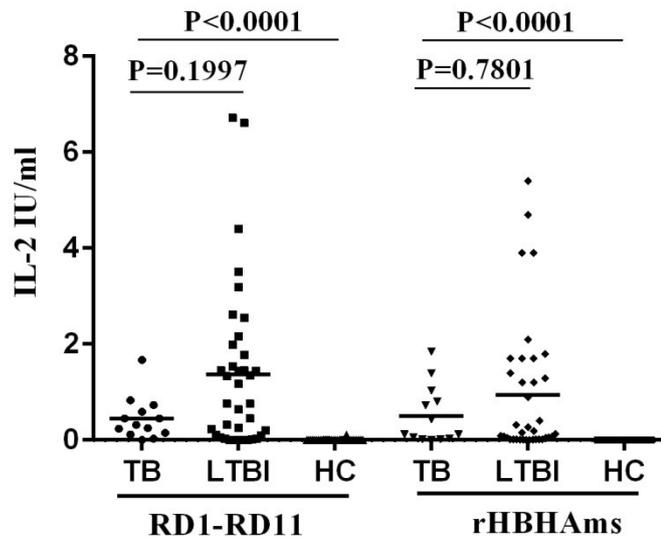


Figura 17. Confronto nella produzione di IL-2 dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 e rHBHAm.

In questo studio è stata valutata anche la produzione di IFN- γ e IL-2 dopo 72 ore di incubazione con gli antigeni RD1-RD11, mettendola a confronto con quella ottenuta dopo 24 ore di stimolazione sempre con gli stessi antigeni.

Determinazione di IFN- γ dopo 72 h di incubazione con gli antigeni RD1-RD11.

Il valore di cut-off è stato di 0.35 IU/ml. È stata dimostrata una differenza significativa nella produzione media di IFN- γ tra il gruppo con infezione tubercolare (TB e LTBI) e il gruppo di soggetti sani ($P<0.0001$). Non è stata dimostrata nessuna differenza statisticamente positiva tra il gruppo con LTBI attiva e il gruppo con TB attiva ($P=0.1781$). Infatti la produzione media di IFN- γ è stata pari a 7.7 IU/ml per il gruppo LTBI e pari a 9.6 IU/ml per il gruppo TB (Figura 18) . Non è stata trovata nessuna differenza significativa nella risposta positiva tra il gruppo TB e il gruppo LTBI

(P=0.2600). Infatti, nel gruppo TB 12 dei 13 pazienti hanno dato una risposta positiva, mentre tutti i 37 individui con LTBI sono risultati positivi (Tabella 9).

Gruppi (n = 88)	RD1-RD11 24 H			RD1-RD11 72 H	
	IFN-γ (UI/ml)			IFN-γ (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Indeterminato	Positivo	Negativo
TB (n =13)	12	0	1	12	1
LTBI (n= 37)	37	0	0	37	0
HC (n= 38)	0	38	0	0	38

Tabella 9. Risultati ottenuti verso RD1-RD11 alle 24 e 72 ore di stimolazione nei gruppi esaminati.

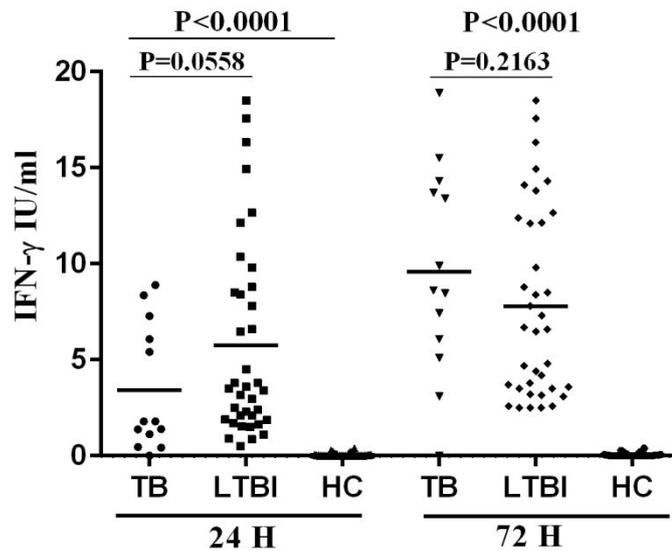


Figura 18. Confronto nella produzione di IFN- γ dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 dopo 24 e 72 ore di stimolazione.

Determinazione di IL-2 dopo 72 h di incubazione con gli antigeni RD1-RD11.

Il valore di cut-off è stato di 1.0 IU/ml. L'analisi statistica ha dimostrato una significativa differenza nella produzione di IL-2 tra il gruppo con infezione tubercolare (TB e LTBI) e il gruppo dei soggetti sani ($P < 0.0001$) e anche tra il gruppo TB e LTBI ($P < 0.0001$) (Figura 19). Infatti, i livelli medi di IL-2 sono stati di 2.1 IU/ml nel gruppo con infezione latente e di 0.5 IU/ml nel gruppo con malattia attiva. È stata dimostrata una differenza significativa nella risposta positiva tra il gruppo con TB attiva e il gruppo con LTBI ($P < 0.0001$). Infatti, 3 dei 13 pazienti TB sono risultati essere positivi, mentre nel gruppo LTBI 32 su 37 individui hanno dato una risposta positiva. Tutti i soggetti sani sono risultati negativi (Tabella 10).

Gruppi (n = 88)	RD1-RD11 24 H		RD1-RD11 72 H	
	IL-2 (UI/ml)		IL-2 (UI/ml)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
TB (n =13)	12	1	3	10
LTBI (n= 37)	27	10	32	5
HC (n= 38)	0	38	0	38

Tabella 10. Risultati ottenuti verso RD1-RD11 alle 24 e 72 ore di stimolazione nei gruppi esaminati.

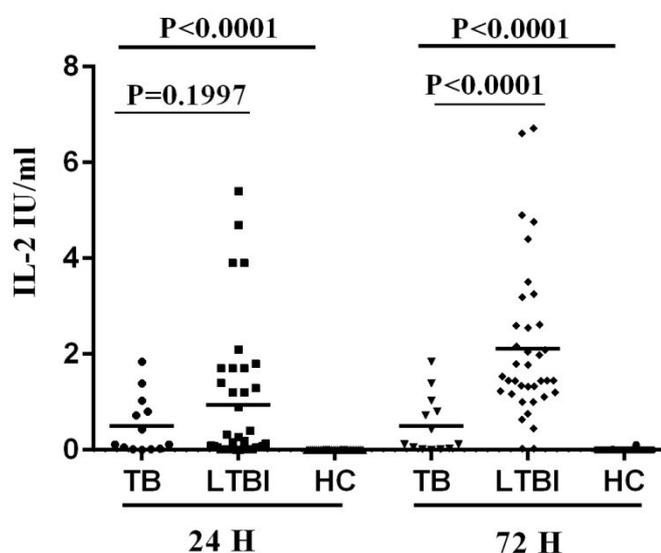


Figura 19. Confronto nella produzione di IL-2 dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11 dopo 24 e 72 ore di stimolazione.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

Discussione

La tubercolosi è una patologia infettiva che si presenta in due forme cliniche, l'infezione tubercolare latente e la malattia attiva, che corrispondono a due fasi distinte dell'infezione. La diagnosi e il trattamento della TB e della LTBI costituiscono priorità assolute, soprattutto nei paesi a bassa incidenza, al fine di controllare la diffusione della tubercolosi (Jensen et al., 2005). Uno dei principali problemi nella lotta contro la tubercolosi è la corretta diagnosi di questi due differenti stati. Pertanto un traguardo molto importante sarebbe quello di sviluppare un test diagnostico che permetta di individuare in modo rapido e specifico gli individui venuti a contatto con il bacillo tubercolare, ma soprattutto che sia in grado di discriminare i soggetti con malattia attiva da quelli con infezione latente. Il gold standard nella diagnosi di TB attiva rimane l'esame colturale, che richiede però tempi lunghi, data la lenta crescita del micobatterio. Per la diagnosi di infezione latente lo strumento più utilizzato è il test cutaneo della tubercolina (TST). Questo test è però limitato da una bassa sensibilità in alcune categorie di soggetti potenzialmente a maggior rischio di sviluppare una TB attiva e da una bassa specificità dovuta alla presenza di più di 200 antigeni, molti dei quali sono presenti oltre che nel *M. tuberculosis*, anche nel *M. bovis* BCG e in molti altri micobatteri non tubercolari. Inoltre il test cutaneo non discrimina tra infezione latente e malattia attiva, fattore che limita l'utilità diagnostica del test, soprattutto nei paesi ad elevata endemia di TB. Recentemente sono stati sviluppati nuovi test diagnostici, basati sul rilascio dell'IFN- γ , che hanno aumentato la sensibilità e la specificità dell'infezione tubercolare (Pai et al, 2008; Thillai M, et al., 2014). Sebbene tali test risultino essere più accurati, un loro limite è di non essere in grado di discriminare tra i due stati dell'infezione da *Mtb*, inoltre non possono essere utilizzati per monitorare l'efficacia della terapia antitubercolare. Molti studi hanno valutato gli aspetti immunologici dell'infezione tubercolare, per capire quali componenti della risposta immunitaria dell'ospite o quali antigeni tubercolari, potessero essere usati per discriminare tra malattia attiva e infezione tubercolare latente. In alcuni di questi studi è stato valutato se ci fossero differenze nella produzione di IFN- γ o di altre citochine o chemochine.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

Secondo tali studi, elevati valori di TNF- α sono associati ai casi di TB attiva; mentre una maggiore produzione di IFN- γ e di IL-2 è associata allo stato di latenza dell'infezione. Altri studi hanno, invece, focalizzato l'attenzione sui linfociti T multifunzionali che secernono, nei due stati dell'infezione tubercolare, simultaneamente tre citochine (IFN- γ /TNF- α /IL-2), due citochine (IFN- γ /TNF- α , IFN- γ /IL-2 o TNF- α /IL-2) oppure una sola (IFN- γ o TNF- α o IL-2) (Caccamo et al., 2010, Harari et al., 2011 e Petruccioli et al., 2013). Partendo da questi risultati, lo scopo del lavoro è stato quello di valutare, oltre alla produzione dell'IFN- γ , anche la produzione di TNF- α e IL-2 per vedere se siano in grado di discriminare i pazienti con TB attiva dai soggetti con LTBI. La produzione di queste due citochine è stata valutata dopo stimolazione dei linfociti T con gli antigeni RD1 e RD11, sia mediante ELISA che citofluorimetria, in tre gruppi di soggetti: TB attiva, LTBI e HC. Poiché l'ELISA e la citofluorimetria si basano sullo stesso principio di rilascio delle citochine dopo stimolazione con specifici antigeni, non ha sorpreso una concordanza tra le risposte T cellulari ottenute con la citofluorimetria e i risultati ottenuti con l'ELISA. I dati ottenuti hanno dimostrato che i livelli di IFN- γ , di TNF- α e di IL-2 sono stati differenti tra i tre gruppi saggiati. Nello specifico, i livelli di tutte e tre le citochine sono risultati essere significativamente più elevati nel gruppo con infezione tubercolare (TB e LTBI) rispetto al gruppo dei soggetti sani; mentre nessuna citochina, singolarmente, è stata in grado di discriminare tra i gruppi LTBI e TB. Questi risultati concordano in parte con diversi studi che dimostrano che l'infezione da *Mtb* induce una risposta Th1, con elevati livelli di IFN- γ , di TNF- α e di IL-2; mentre, si discostano per quanto riguarda la loro capacità di discriminare tra TB attiva e LTBI. Di particolare rilevanza è il fatto che nel gruppo LTBI, la citofluorimetria, a differenza del QFT, ha rilevato 14 soggetti negativi. Molto probabilmente questi valori rientrano all'interno di quella che viene definita "zona grigia" del QFT, che comprende quei valori, che vanno da 0.35 a 0.8 IU/ml, che possono, con la ripetizione del test, revertire o convertire. Purtroppo, nessuno di questi pazienti è ritornato per un secondo controllo. Mediante analisi citofluorimetrica, sono state testate altre citochine (IL-17, IL-10, IL-6 e IL-4) che sono coinvolte nella patogenesi della tubercolosi e che, secondo alcune ricerche, potrebbero essere associate

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

allo stato di malattia attiva. I risultati di questo lavoro non hanno registrato una significativa produzione di queste citochine tra il gruppo con infezione tubercolare e il gruppo controllo sano. I dati ottenuti concordano per le citochine IL-17, IL-10 e IL-4, ma anche si discostano, per l'IL-6, da quelli di differenti lavori presenti in letteratura (Sutherland et al., 2010; Kim et al., 2012; Jeong et al., 2014; Joshi et al., 2015; Kim et al., 2015). Il simultaneo rilevamento di molteplici citochine secrete dalle cellule T, in seguito a stimolazione con antigeni specifici, è il principale vantaggio della citofluorimetria rispetto ai saggi IGRA. Inoltre, al contrario dei saggi IGRA, la performance diagnostica della citofluorimetria non è influenzata dalla presenza di stati immunosoppressivi e dalla cross-reattività con micobatteri non tubercolari. Infine, la citofluorimetria, dal momento che caratterizza diversi subset dei linfociti T associati ai differenti stati dell'infezione, consentirebbe una rapida identificazione dei soggetti affetti da malattia attiva, con conseguente tempestivo avvio della terapia antitubercolare e quindi con un maggior controllo della diffusione della tubercolosi. Diversi studi hanno saggiato differenti antigeni tubercolari, legati allo stato di latenza dell'infezione e alla riattivazione della malattia, come probabili biomarkers nel discriminare tra malattia attiva e infezione latente. Un antigene tubercolare che è risultato essere un eccellente biomarker per la diagnosi tubercolare è l'HBHA, un'adesina micobatterica (Pethe et al., 2001). In un lavoro del 2011 (Delogu et al., 2011), tra i soggetti positivi al QFT-TB, è stata utilizzata l'HBHA come strumento per identificare le diverse fasi della tubercolosi. Nel seguente lavoro si è voluto determinare la produzione di IFN- γ , TNF- α e IL-2 con l'antigene HBHA e metterla poi a confronto con la produzione delle stesse citochine dopo stimolazione con gli antigeni RD1-RD11. È stata utilizzata l'HBHA metilata (rHBHAs), purificata da un ceppo di *M. smegmatis* ricombinante, costruito da Delogu et al. (Delogu et al., 2004), che è risultata essere capace di discriminare i soggetti con differenti stati di TB. Rispetto alla purificazione della forma nativa dell'HBHA, la purificazione di questa proteina è più facile, più economica e richiede tempi molto brevi, data la rapida crescita di *M. smegmatis*. Per l'IFN- γ , una risposta positiva non è stata osservata in nessun paziente con TB attiva, mentre si è avuta nella quasi totalità degli individui con LTBI. Al contrario, con gli antigeni RD1-RD11, una risposta IFN- γ

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

positiva è stata osservata in quasi tutti i pazienti TB e in tutti i soggetti LTBI. Considerando il livello medio di IFN- γ prodotto dopo stimolazione con l'rHBHAm, è stato dimostrato che, nei pazienti malati, questa citochina viene prodotta in quantità significativamente inferiore rispetto al gruppo LTBI. Questi risultati sono in accordo con quelli riportati nel lavoro di Delogu del 2011, che indicano che l'rHBHAm può discriminare, tra i soggetti che presentano una risposta positiva agli antigeni RD1-RD11, quelli con TB attiva da quelli con LTBI. Pertanto, gli individui che rispondono ad entrambi i test, sono soggetti in grado di controllare la replicazione di Mtb (LTBI), mentre i soggetti che rispondono solo al QFT-IT sono quelli che presentano malattia attiva. Questi risultati sottolineano l'utilità dell'rHBHAm come marcatore di infezione latente e confermano che, durante la tubercolosi attiva, la risposta IFN- γ -HBHA specifica è compromessa. Molti studi indicano che la bassa produzione di IFN- γ -HBHA specifica nei pazienti con TB attiva è determinata dalla soppressione da parte dei linfociti Treg circolanti. Tuttavia, questi livelli relativamente bassi non possono essere solo determinati dalla soppressione da parte delle cellule Treg. Secondo un lavoro di Place et al., la bassa produzione di IFN- γ -HBHA specifica, nei soggetti con TB attiva, potrebbe essere determinata dal reclutamento dei linfociti T che secernono IFN- γ -HBHA specifico nel sito di malattia. Osservando la quantità di TNF- α -rHBHA specifica, è stata rilevata una significativa maggior produzione di tale citochina nel gruppo TB rispetto al gruppo LTBI; così come è stata determinata una significativa risposta positiva tra i due gruppi. Al contrario, in seguito alla stimolazione con gli antigeni RD1-RD11, non è stata osservata nessuna differenza significativa nella produzione di TNF- α e nella risposta positiva tra il gruppo TB e il gruppo LTBI. Questi risultati concordano con numerosi studi che mostrano come la risposta immunitaria nella TB attiva è dominata da linfociti T che esprimono solo TNF- α (Harari et al., 2011; Sutherland et al., 2009). Per quanto riguarda l'IL-2, non è stata osservata nessuna differenza significativa né a livello qualitativo (risposta positiva), né a livello quantitativo (produzione media) tra il gruppo TB e il gruppo LTBI dopo stimolazione sia con l'rHBHAm che con gli antigeni RD1-RD11. Alcuni studi hanno determinato che la produzione antigenica specifica di IFN- γ e IL-2 è associata con diversi stati clinici

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

e carica antigenica in alcune malattie virali e batteriche. Questi studi suggeriscono che la TB trattata o l'infezione latente, caratterizzate da una bassa carica antigenica, come la presentano un profilo immunologico dominato dalle cellule T che secernono IFN- γ /IL-2 e cellule T che secernono solo IL-2; al contrario, la TB attiva non trattata, con elevata carica antigenica, è dominata dalle cellule T che secernono solo IFN- γ (Millington et al., 2007; Sester et al., 2011; Harari et al., 2011). Sulla base di questi studi, in questo lavoro è stata determinata la produzione di IFN- γ e IL-2 dopo 72 ore di stimolazione in vitro con gli antigeni RD1-RD11, mettendola a confronto con quella ottenuta dopo 24 ore di stimolazione con gli stessi antigeni. I risultati ottenuti concordano con quelli presenti nel lavoro di Biselli del 2009 e hanno dimostrato che la quantità di IFN- γ , determinata sia alle 24 che alle 72 ore di stimolazione, non è in grado di distinguere i due stati dell'infezione da *Mtb*. Al contrario, mentre alle 24 ore di stimolazione, la quantità di IL-2 è inadeguata per discriminare gli individui con infezione tubercolare, dopo 72 ore di stimolazione, la quantità di IL-2 è aumentata solo negli individui con LTBI. Presi assieme, questi risultati dimostrano che i pazienti con TB attiva mostrano una risposta T cellulare RD1/RD11 specifica a lungo termine caratterizzata da un'alta produzione di IFN- γ e bassa produzione di IL-2; mentre gli individui con infezione latente sono caratterizzati da un'elevata produzione sia di IFN- γ che di IL-2. Questi dati sono in accordo con quelli di altri studi che indicano un aumento del numero di cellule T che secernono IL-2 e IFN- γ /IL-2 e una riduzione del numero di cellule T che producono IFN- γ negli individui LTBI rispetto ai pazienti TB, a causa della riduzione della carica antigenica di *Mtb* (Lanzavecchia et Sallusto, 2000; Millington et al., 2007). La presenza delle cellule T che producono IL-2 nella malattia attiva, quando la carica antigenica è alta, potrebbe suggerire un coinvolgimento di queste cellule nella fase iniziale della risposta immunitaria a *Mtb* attraverso l'espansione clonale delle cellule T, che successivamente si differenzieranno in cellule T produttrici di IFN- γ , mentre l'incremento della produzione sia di IFN- γ che di IL-2 negli individui con infezione latente potrebbe riflettere il mantenimento di una stabile risposta effettrice. Questo studio presenta, tuttavia, alcuni limiti. Primo fra tutti, è il numero relativamente piccolo di individui esaminati. Pertanto questi dati, per essere confermati, necessitano di

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

un'ulteriore replica in un campione più grande, reclutando più soggetti specialmente quelli con condizioni di immunodeficienza come l'infezione da HIV, o in trattamento con farmaci immunosoppressivi. Infatti, lo screening dell'infezione tubercolare, mediante i saggi IGRA, in questi soggetti è alquanto limitato da un tasso relativamente basso di rilevamento e da un numero consistente di risultati indeterminati. In conclusione, sebbene l'IFN- γ , il TNF- α e l'IL-2 siano potenziali biomarkers nel distinguere i gruppi con o senza infezione tubercolare, singolarmente non discriminano tra LTBI e TB. Tuttavia, questo lavoro suggerisce la possibilità di utilizzare la proteina HBHA o di determinare la produzione a lungo termine di IL-2 e IFN- γ per poter discriminare tra malattia attiva e infezione latente. Infatti, i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'uso combinato del QFT e di rHBHAs, mediante il rilevamento di IFN- γ e TNF- α , oppure la determinazione, dopo una stimolazione a lungo termine, dell'IL-2 e dell'IFN- γ , potrebbero essere potenziali e per il momento unici strumenti diagnostici in grado di discriminare i soggetti con infezione latente da quelli con malattia attiva.

Bibliografia

World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014.

Raviglione MC, Uplekar M. WHO's new Stop TB strategy. *The Lancet*, 2006, 367: 952-5.

Matteo Zignol, Wayneven G et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an update analysis, 2012

Wright A, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-07: an updated analysis of the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *Review Lancet*. 2009 May 30; 373(9678):1861-73. Epub 2009 Apr 15.

European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, 2014.

Morandi M., D'Amato S, Suligoj B. et al. La Tuberculosis in Italia. Rapporto 2008. Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità e Agenzia Sanitaria e Sociale dell'Emilia-Romagna

Moher D. The internationally recommend tuberculosis control strategy. World Health Organization. *Trop. Doct.* 29: 185-186

Draper P. The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Review. Front Biosci.* 1998 Dec 15;3:D1253-61.

- Fätkenheuer G, Taelman H, Lepage P, Schwenk A, Wenzel R. The return of tuberculosis. Review. *Diagn Microbiol InfectDis.* 1999 Jun;34(2):139-46.
- Kaufman SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunol* 2001; 1:20-30.
- Cole ST., et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. 1998. *Nature*; 393:537-44.
- Ducati RD., et al. The resumption of consumption. A review on tuberculosis. 2006. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 101:697-714.
- Brennan PJ., Draper P. Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*. In *tuberculosis: Pathogenesis, protection and control.* 1994. B.R. Bloom, ed., ASM, Washington, D.C.; 271-284.
- Roland R., et al. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid containing glycolipids. 2001. Review. *Microbiol. Immunol.*; 45(12):801-811.
- Spargo BJ., et al. Cord Factor inhibits fusion between phospholipid vesicles. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 88:737-40.
- Brightbill HB., et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. 1999. *Science*; 285:732-36.
- Ciaramella A., et al. Cell wall associated 19 kDa lipoprotein induces apoptosis and IL-1 β release in the course of mycobacterial infection. 2004. *J. Infect. Dis.*; 190:1167-76.

- Aderem A., Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. 2000. *Nature*; 406:782-87.
- Locati M., et al. Selective induction of phospholipase D1 in pathogen-activated human monocytes. 2001. *Biochem. J.*; 358:119-125.
- Schorey JS., Cooper AM. Macrophage signaling upon mycobacterial infection: the MAP kinase lead the way. 2003. *Cell Microbiol.*; 5:133-42.
- Fratti RA., et al. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 9:5437-5442.
- Havir DV, Barnes PF. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. Review. *N Engl J Med.* 1999Feb 4;340(5):367-73.
- Diel R. et al. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006May 17;7:77.
- Daëron M. Fc receptor biology. Review. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:203-34.
- Dheda K., et al. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. Review. *Respirology.* 2010 Apr;15(3):433-50
- Marcos V da Silva, et al. Expression Pattern of Transcription Factors and Intracellular Cytokines Reveals That Clinically Cured Tuberculosis Is Accompanied by an Increase in *Mycobacterium*-Specific Th1, Th2, and Th17 Cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 591237. Published online 2015 April 27.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

- Perreau M, Rozot V, et al. Lack of *Mycobacterium tuberculosis*-specific interleukin-17A-producing CD4+ T cells in active disease. *Eur. J. Immunol.* 2013 Apr;43(4):939-48.
- Kaufmann SH. Tuberculosis vaccines: time to think about the next generation. Review. *Semin Immunol.* 2013 Apr;25(2):172-81.
- Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. Review. *Infect Immun.* 2001 Jul;69(7):4195-201.
- Canaday DH, et al. Activation of Human CD8+ alpha beta TCR1+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J Immunol.* 1999 Jan 1;162(1):372-9.
- Houde M, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature.* 2003 Sep 25;425(6956):402-6.
- Moody DB, et al. The molecular basis of CD1-mediated presentation of lipid antigens. Review. *Immunol Rev.* 1999 Dec;172:285-96.
- Canaday DH, et al. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J Immunol.* 2001 Sep 1;167(5):2734-42.
- Stenger S, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998 Oct 2;282(5386):121-5.
- Stenger S, Modlin RL. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Review. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999 Feb;2(1):89-93.

- Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual non fusion pattern and observations on bacterial survival. *J ExpMed.* 1975 Jul 1;142(1):1-16.
- Tailleux L, et al. Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol.* 2003 Feb 15;170(4):1939-48.
- Grogan A et al. Cytosolic phox proteins interact with and regulate the assembly of coronin in neutrophils. *J Cell Sci.* 1997 Dec; 110:3071-81.
- Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 1999 May 14;97(4):435-47.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 1994 Feb 4;263(5147):678-81.
- Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, Porter B, Iyer SS, Kusner DJ. *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):2811-5.
- Spiegel S, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):25851-4.

- Kusner DJ, Adams J. ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. *J Immunol.* 2000 Jan 1;164(1):379-88.
- Chan J., Fan XD., Hunter SW., Brennan PJ., Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. 1991 *Infect. Immun.*; 59:1755-61
- Cosma CL et al. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. Review. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:641-76.
- Zhang Y, et al. Resuscitation of dormant *Mycobacterium tuberculosis* by phospholipids or specific peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 Jun 8; 284:542-547.
- Gupta RK, Srivastava R. Resuscitation Promoting Factors: a Family of Microbial Proteins in Survival and Resuscitation of Dormant Mycobacteria. *Indian J Microbiol.* 2012 Jun;52(2):114-21.
- Jensen PA, et al.. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in health-care settings, 2005. *MMWR Recomm Rep.* 2005 Dec 30;5:1-141.
- Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? Review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006 Nov;10(11):1192-204.
- Pouchot J, et al. Reliability of tuberculin skin test measurement. *Ann Intern Med.* 1997 Feb 1;126(3):210-4.

- Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. Review. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Jan;159(1):15-21.
- Thillai M, et al. Interferon-gamma release assays for tuberculosis: current and future applications. Expert Rev Respir Med. 2014 Feb;8(1):67-78.
- Mahairas GG, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J Bacteriol. 1996 Mar;178(5):1274-82.
- Lalvani A, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med. 2001 Mar;163(4):824-8.
- Brock I, et al. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. Respir Res. 2006 Apr 1;7:56.
- Mazurek GH, Villarino ME. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 2003 Jan 31;52(RR-2):15-8.
- Aagaard C, et al. Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Infect Dis. 2004 Mar 1;189(5):812-9.
- Lalvani A, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Lancet 2001;357:2017-2021.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

- Pai M, et al. Systematic Review: T cell-based Assay for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Ann Intern Med.* 2008 August 5; 149(3): 177-184.
- Pai M, et al. Serial testing of health care workers for tuberculosis using IFN- γ assay. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:349-55.
- Jensen PA et al. Guidelines for preventing the transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Healthcare Setting, 2005. *MMWR* 2005; 54:1-141.
- Perry S, et al. Reproducibility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(3): 425-32.
- Pai M, et al. T-cell assay conversion and reversion among household contacts of tuberculosis patients in rural India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:84-92.
- Sester U, et al. Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *PLoSOne.* 2011 Mar 15;6(3).
- Harari A, et al. Dominant TNF- α + *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat Med.* 2011 Mar;17(3):372-6.
- Petruccioli E, et al. IFN γ /TNF α specific-cells and effector memory phenotype associate with active tuberculosis. *J Infect.* 2013 Jun;66(6):475-86.
- Caccamo N, et al. Multifunctional CD4+ T cells correlate with active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol.* 2010 Aug;40(8):2211-20.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

Wang S, et al. Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population. PLoSOne. 2012;7(12).

Kim SY, et al. The responses of multiple cytokines following incubation of whole blood from TB patients, latently infected individuals and controls with the TB antigens ESAT-6, CFP-10 and TB7.7. Scand JJ Immunol. 2012; 76:580-86.

Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, Sauzullo I, Lastilla M, Mengoni F, Vanini V, Girardi E, Goletti D, D' Amelio R, Nisini R. Detection of interleukin-2 in addition to interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. Clin Microbiol Infect. 2010 Aug;16(8):1282-4.

Lu C, Wu J, Wang H, Wang S, Diao N, Wang F, Gao Y, Chen J, Shao L, Weng X, Zhang Y, Zhang W. Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. PLoSOne. 2011;6(8).

Lack GF, et al. Immunogenicity of novel DosR regulon-encoded candidate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in three high-burden populations in Africa. Clin Vaccine Immunol. 2009 Aug;16(8):1203-12.

Goletti D, Butera O, Vanini V, Lauria FN, Lange C, Franken KL, Angeletti C, Ottenhoff TH, Girardi E. Response to Rv2628 latency antigen associates with cured tuberculosis and remote infection. Eur Respir J. 2010 Jul;36(1):135-42.

- Commandeur S, van Meijgaarden KE, Prins C, Pichugin AV, Dijkman K, van den Eeden SJ, Friggen AH, Franken KL, Dolganov G, Kramnik I, Schoolnik GK, Oftung F, Korsvold GE, Geluk A, Ottenhoff TH. An unbiased genome-wide *Mycobacterium tuberculosis* gene expression approach to discover antigens targeted by human T cells expressed during pulmonary infection. *J Immunol*. 2013 Feb 15;190(4):1659-71.
- Serra-Vidal MM, Latorre I, Franken KL, Díaz J, de Souza-Galvão ML, Casas I, Maldonado J, Milà C, Solsona J, Jimenez-Fuentes MÁ, Altet N, Lacoma A, Ruiz-Manzano J, Ausina V, Prat C, Ottenhoff TH, Domínguez J. Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2014 Oct 8;5:517.
- Aviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. 1995. *J. Am. Med. Assoc.* Jan 18; 273(3):220-226.
- Noordeen SK, Lopez Bravo L, Sundaresan TK. Estimated number of leprosy cases in the world. *Indian J Lepr*. 1992 Oct-Dec;64(4):521-7.
- Horsburgh CR Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*. 1991 May 9;324(19):1332-8.
- Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Loch C, Menozzi FD. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature*. 2001 Jul 12;412(6843):190-4.

- Menziozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Locht C. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med.* 1996 Sep 1;184(3):993-1001.
- Delogu, G. and Brennan, M. J. Functional domains present in the mycobacterial hemagglutinin, HBHA. 1999. *J. Bacteriol.* 7464-7469.
- Menziozzi FD, Bischoff R., Fort E., Brennan MJ., Locht C. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin. *PNAS* 1998; 95:12625-12630.
- Pethe K., Aumercier M., Fort E., Gatot C., Locht C., Menozzi FD. Characterization of the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin. *J. Biol. Chem.* 2000 May 12;275(19):14273-80.
- Pethe K, Bifani P, Drobecq H, Sergheraert C, Debrie AS, Locht C, Menozzi FD. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10759-64.
- Pethe K, Puech V, Daffé M, Josenhans C, Drobecq H, Locht C, Menozzi FD. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39 (1):89-99.
- Temmerman S, Pethe K, Parra M, Alonso S, Rouanet C, Pickett T, Drowart A, Debrie AS, Delogu G, Menozzi FD, Sergheraert C, Brennan MJ, Mascart F, Locht C. Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium*

tuberculosis heparin-binding hemagglutinin. *Nat Med.* 2004;10:935–941.

Masungi C, Temmerman S, Van Vooren JP, et al. Differential T and B cell responses against *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin adhesin in infected healthy individuals and patients with tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases.* 2002;185(4):513–520.

Hougardy JM, Schepers K, Place S, Drowart A, Lechevin V, Verscheure V, Debie AS, Doherty TM, Van Vooren JP, Loch C, Mascart F. Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN-gamma release as a diagnostic tool for latent tuberculosis. *PLoS One.* 2007;2:e926.

Place S, Verscheure V, de San N, Hougardy JM, Schepers K, Dirix V, Dediste A, Michel O, Drowart A, Allard SD, Doherty TM, Lecher S, Loch C, Mascart F. Heparin-binding, hemagglutinin-specific IFN-gamma synthesis at the site of infection during active tuberculosis in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:848–854.

Shin AR, Lee KS, Lee JS, Kim SY, Song CH, Jung SB, Yang CS, Jo EK, Park JK, Paik TH, Kim HJ. *Mycobacterium tuberculosis* HBHA protein reacts strongly with the serum immunoglobulin M of tuberculosis patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2006 Aug;13(8):869-75.

Delogu G, Bua A, Pusceddu C, Parra M, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. Expression and purification of recombinant methylated HBHA in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Oct 1;239(1):33-9.

Zanetti S, Bua A, Delogu G, Pusceddu C, Mura M, Saba F, Pirina P, Garzelli C, Vertuccio C, Sechi LA, Fadda G. Patients with pulmonary tuberculosis develop a strong humoral response against methylated

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

85

heparin-binding hemagglutinin. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Sep;12(9):1135-8.

Delogu G, Chiacchio T, Vanini V, Butera O, Cuzzi G, Bua A, Molicotti P, Zanetti S, Lauria FN, Grisetti S, Magnavita N, Fadda G, Girardi E, Goletti D. Methylated HBHA produced in *M. smegmatis* discriminates between active and non-active tuberculosis disease among RD1-responders. PLoS One. 2011 Mar 29;6(3):e18315.

Savolainen L, Pusa L, Kim HJ, Sillanpää H, Seppälä I, Tuuminen T. Pilot study of diagnostic potential of the *Mycobacterium tuberculosis* recombinant HBHA protein in a vaccinated population in Finland. PLoS One. 2008 Sep 25;3(9):e3272.

Molicotti P, Bua A, Cubeddu M, Cannas S, Delogu G, Zanetti S. Tuberculosis patients are characterized by a low-IFN- γ /high-TNF- α response to methylated HBHA produced in *M. smegmatis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 Dec;71(4):449-52.

Sutherland JS, de Jong BC, Jeffries DJ, Adetifa IM, Ota MO. Production of TNF-alpha, IL-12(p40) and IL-17 can discriminate between active TB disease and latent infection in a West African cohort. PLoS One. 2010 Aug 24;5(8):e12365.

Kim S, Lee H, Kim H, Kim Y, Cho JE, Jin H, Kim DY, Ha SJ, Kang YA, Cho SN, Lee H. Diagnostic performance of a cytokine and IFN- γ -induced chemokine mRNA assay after *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen stimulation in whole blood from infected individuals. J Mol Diagn. 2015 Jan;17(1):90-9.

Marina Cubeddu

Confronto di metodologie per l'identificazione della tubercolosi latente e attiva

International PhD School in Biomolecular and Biotechnological Sciences

Università degli Studi di Sassari

86

- Jeong YH, Hur YG, Lee H, Kim S, Cho JE, Chang J, Shin SJ, Lee H, Kang YA, Cho SN, Ha SJ. Discrimination between active and latent tuberculosis based on ratio of antigen-specific to mitogen-induced IP-10 production. *J Clin Microbiol*. 2015 Feb;53(2):504-10.
- Joshi L, Ponnana M, Sivangala R, Chelluri LK, Nallari P, Penmetsa S, Valluri V, Gaddam S. Evaluation of TNF- α , IL-10 and IL-6 Cytokine Production and Their Correlation with Genotype Variants amongst Tuberculosis Patients and Their Household Contacts. *PLoS One*. 2015 Sep 11;10(9):e0137727.
- Sutherland JS, Adetifa IM, Hill PC, Adegbola RA, Ota MO. Pattern and diversity of cytokine production differentiates cytokine production differentiates between *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Eur J Immunol*. 2009 Mar;39(3):723-9.
- Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, Guyot-Revol V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):5217-26.
- Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors and memory cells. *Science*. 2000 Oct 6;290(5489):92-7. Review.