

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

**SCUOLA DI DOTTORATO**

*Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali*

**DIPARTIMENTO**

*Scienze Biomediche e Cliniche “Luigi Sacco”*

**CORSO DI DOTTORATO**

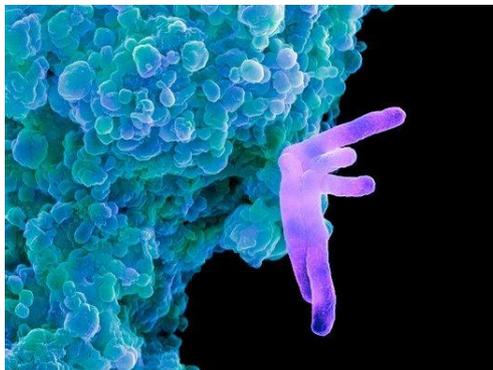
*Malattie Infettive XXVI ciclo*

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**Genotipizzazione molecolare e analisi clinica**

**di pazienti con tubercolosi multiresistente nell’hinterland Milanese**

**LR5**



**DOTTORANDA: Consuelo Schioli**

**Matricola: R09269**

**COORDINATORE DEL DOTTORATO: Chiarissima Prof.ssa D’Arminio Monforte**

**TUTOR: Fabio Franzetti**

**A.A. 2012-2013**

# **INDICE**

## **1. Introduzione**

### **1.1 Aspetti microbiologici**

*1.1.1 Paleontologia della tubercolosi*

*1.1.2 Mycobacterium tuberculosis Complex*

*1.1.3 Caratteristiche di M. tuberculosis*

*1.1.4 Genoma di M. tuberculosis*

*1.1.5 Principi generali dell'evoluzione batterica*

*1.1.6 Storia dell'evoluzione molecolare di M. tuberculosis*

*1.1.7 Strategie per la generazione di variazione genica*

*1.1.8 Tassonomia di M. tuberculosis*

*1.1.9 Analisi filogenetica*

*1.1.10 Macrofamiglie genotipiche di M. tuberculosis Complex e loro distribuzione geografica secondo il Fourth International Spoligotyping Database (SpolDB4)*

### **1.2 Patogenesi**

*1.2.1 Diffusione e progressione della tubercolosi*

*1.2.2 Ruolo dei linfociti T helper CD4+ e T citotossici CD8+*

### **1.3 Diagnosi**

*1.3.1 Diagnosi di tubercolosi di tipo microbiologico*

*1.3.2 Diagnosi radiologiche e immunologiche*

### **1.4 Terapia**

*1.4.1 Emergenza e trattamento di tubercolosi farmaco resistenti*

*1.4.2 Vaccino*

*1.4.3 Il problema delle ricorrenze*

## **2. Scopo del progetto**

## **3. Materiali e metodi**

### **3.1 Popolazione d'interesse**

### **3.2 Estrazione e lisi al calore**

### **3.3 Genotipizzazione Molecolare**

*3.3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism DNA Fingerprinting*

*3.3.2 Mycobacterial Interspersed Repetitive Units Variable Number Tandem Repeats*

*3.3.3 Spacer Oligonucleotide Typing*

*3.3.4 Costruzione di dendrogrammi con Software bioinformatici*

### **3.4 Analisi statistica**

## ***4. Risultati***

***4.1 Analisi temporale di diffusione dei casi di MDR nell'area milanese a partire dagli anni '90***

***4.2 Confronto tra le caratteristiche cliniche dei pazienti MDR e pazienti non-MDR***

***4.3 Descrizione dei principali cluster di pazienti MDR e analisi di fattori di rischio***

***4.4 Ricerca di associazioni fra le caratteristiche dei pazienti MDR con differenti lineages di *M. tuberculosis****

***4.5 Analisi dei profili di resistenza ai farmaci antitubercolare in episodi di TB ricorrente***

## ***5. Discussione***

## ***6. Bibliografia***

## ***7. Ringraziamenti***

# ***1. Introduzione***

## ***1.1 Aspetti microbiologici***

### ***1.1.1 Paleontologia della tubercolosi* (1-2)**

In senso sia biologico che culturale l'evoluzione adattativa della specie umana è profondamente influenzata dalle patologie. Esse variano nel tempo, in relazione a fattori socioambientali, tecnologici ed etnici. La disciplina che si occupa dello studio delle malattie nell'antichità si chiama 'paleopatologia'. Tradizionalmente la ricerca paleopatologica utilizza fonti indirette (antichi testi e iconografie), fonti dirette (resti scheletrici, mummie e altri materiali biologici di origine umana) e fonti comparative (informazioni concernenti le malattie in altre specie animali). Oggi la possibilità di analizzare DNA conservato in antichi reperti ossei o nei tessuti molli delle mummie apre la strada alla paleopatologia molecolare. In linea di principio si possono studiare infezioni, malattie ereditarie e neoplasie. Mentre la paleopatologia molecolare delle malattie ereditarie e quella delle neoplasie sono ancora a uno stadio pionieristico, la paleopatologia delle infezioni ha già prodotto numerosi risultati (3).

Tale scienza quindi consiste nel cercare il DNA di agenti patogeni di natura batterica, virale, protozoaria o fungina che, in relazione allo stato della malattia, possono essere presenti in maniera significativa nei tessuti molli, nel sangue o in lesioni ossee alla morte dell'individuo. Per quanto riguarda la ricerca di patogeni batterici nei contesti archeologici, fino a ora, è stato possibile individuare il DNA di *Mycobacterium tuberculosis*, agente causativo della tubercolosi (TB), quello di *M. leprae* (agente causativo della lebbra), di *Yersinia pestis* (peste) e di *Treponema pallidum* (sifilide). Tra i patogeni sopraelencati quello di gran lunga meglio studiato è *M. tuberculosis*. Il principio della diagnosi paleomolecolare di questo batterio si basa sull'amplificazione mediante Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) di un breve tratto del cromosoma batterico denominato 'sequenza di inserzione (IS) 6110'. Tale sequenza è specifica per i micobatteri del cosiddetto 'complesso di *M. tuberculosis*' (MTB) che comprende, oltre a *M. tuberculosis* stesso, anche *M. bovis* e *M. africanum*. È così possibile discriminare tra il DNA dei micobatteri del terreno, verosimilmente abbondanti nei materiali di scavo, e quello degli antichi patogeni (3).

La TB ha costituito per secoli un vero e proprio stereotipo di malattia "fatale". Nel corso dei secoli è stata una continua minaccia per l'uomo, in particolar modo nelle aree urbane e densamente popolate, dove si sono verificati frequenti fenomeni epidemici responsabili della attuale pandemia.

Questa malattia, causata appunto dal batterio *M. tuberculosis*, è una patologia tuttora diffusa nel mondo. Durante gli anni '80 del secolo scorso la TB ha cessato di rappresentare un problema di salute pubblica. In questi ultimi anni si è verificato nel mondo occidentale un nuovo aumento di casi in pazienti immunodepressi o in immigrati da paesi del Terzo Mondo, dove la malattia è purtroppo ancora endemica. Si ipotizza che in origine la TB fosse una malattia bovina e che la trasmissione da animale ad animale

avvenisse principalmente per via aerea attraverso l'inalazione di goccioline emesse dai capi infetti. La prima scoperta certa del *Mycobacterium tuberculosis* è nei resti di un bisonte di circa 18.000 anni fa. E' dunque verosimile pensare che sia stata trasmessa, almeno inizialmente, all'uomo tramite un vettore animale, in particolare attraverso l'ingestione di carne infetta, cruda o poco cotta (4). Non ci sono però reperti paleopatologici di TB attribuibili ai piccoli gruppi di cacciatori-raccoglitori pleistocenici. Il momento più probabile in cui possa essere avvenuto questo passaggio è individuabile nel Neolitico del Vicino Oriente, nella cosiddetta "mezzaluna fertile" (Valle del Nilo, Siria, Valle fra il Tigri e l'Eufrate). E' probabile infatti in questo periodo e in questa regione che, con l'adozione della pratica dell'allevamento, si siano realizzate una serie di condizioni favorevoli alla trasmissione della malattia dall'animale all'uomo. Il bestiame diventò infatti una fonte regolare di approvvigionamento di carne e di latte e si verificava un contatto più ravvicinato e prolungato con gli animali; inoltre, i gruppi umani diventarono più sedentari e numerosi, favorendo la diffusione endemica della malattia.

Lesioni tipiche di una spondilite tubercolare sono state rinvenute in uno scheletro appartenente ad un individuo di sesso maschile, di circa 15 anni, proveniente dalla grotta delle Arene Candide (Liguria) e datato al 4000-3500 a.C. La colonna è affetta da una marcata cifosi toraco-lombare, con formazione di un gibbo angolare di 90° per distruzione dei corpi dell'undicesima e dodicesima vertebra toracica. In particolare, la manifestazione vertebrale, o morbo di Pott, è stata individuata anche in alcuni scheletri (mummie naturali e artificiali dell'antico Egitto) nei quali è stato identificato del DNA di *M. tuberculosis* risalenti al Predinastico (3300 a.C.) e in altri scheletri distribuiti lungo tutto l'arco della storia egizia, come l'Antico Regno, il Nuovo Regno e il Periodo Cristiano (5).

In studi più recenti, sempre in materiali egizi, è stata verificata la possibilità di una diagnosi molecolare di TB, tramite il DNA genomico antico. Nuove analisi infatti hanno fornito prove di evidenza genetica a supporto dell'ancestore comune del complesso della TB che si sarebbe sviluppato circa 40000 anni fa nell'Est dell'Africa, la regione nella quale la moderna popolazione umana si diffuse attorno allo stesso periodo. Questo step iniziale fu seguito da 10000 a 20000 anni più tardi dalla espansione di due maggiori *lineage*, uno dei quali si trasmise dall'uomo agli animali (Figura 1).



**Figura1 - Origine e diffusione del *M. tuberculosis complex* (6).**

Questi ultimi risultati hanno sollevato un considerevole dibattito tra gli specialisti, in quanto contrastano con le stime teoriche ed empiriche sulla conservazione del DNA nei climi caldi. Tali stime indicano un tempo di sopravvivenza del DNA molto breve e pertanto incompatibile non solo con la sua presenza nelle mummie predinastiche, ma anche in quelle della più tarda epoca dinastica (Figura 2).



**Figura 2 - Mummia Egizia presso il British Museum di Londra (7).**

A loro volta, i sostenitori della verosimiglianza delle diagnosi molecolari nelle mummie egizie sottolineano diversi aspetti particolari della biologia dei micobatteri, quali la produzione di lesioni calcificate e una parete batterica spessa e ricca di lipidi che favorirebbero la conservazione del DNA per tempi particolarmente lunghi. Fanno inoltre osservare l'eccezionale resistenza di *M. tuberculosis*, in grado di sopravvivere al fissaggio in formalina. Il batterio ha addirittura in un unico caso infettato un incauto imbalsamatore a un anno di distanza dalla morte del soggetto. Ulteriori numerosi reperti archeologici comprendenti più di una trentina di casi, quali scheletri risalenti a oltre 8000 anni fa e mummie delle civiltà Egizie e Inca, hanno portato alla luce lesioni ossee compatibili con l'infezione tubercolare (3).

Phthisis è un termine greco per indicare la TB, dal quale sarebbe poi derivato il termine odierno Tisi; attorno al 460 a.C., Ippocrate aveva identificato la tisi come la più diffusa malattia di tutti i tempi, causa di febbre ed emottisi, quasi sempre fatale (8).

Particolarmente importanti, per le conoscenze sulla diffusione delle malattie infettive a seguito di eventi migratori, sono state le analisi del DNA compiute su mummie precolombiane a partire dalla metà degli anni Novanta del secolo scorso. La prima prova della presenza di TB è associata alla cultura Paracas (dal 750 a.C. al 100 d.C. circa) (9). È stato così possibile confermare l'ipotesi che la TB fosse diffusa anche presso le popolazioni dell'America Meridionale secoli prima della conquista spagnola.

In Epoca alto-medievale la tipologia di insediamenti e l'organizzazione sociale, basata su piccoli alloggi rurali con possibilità limitate di ampi contatti sociali, creavano condizioni sfavorevoli alla diffusione endemica della malattia, la quale era in ogni caso già presente, come attestano ad esempio alcuni casi documentati in Inghilterra a partire dal IV secolo d.C. Con l'avvento del Basso Medioevo, e ancor più con l'Epoca Rinascimentale, si assistette ad un progressivo aumento dell'incidenza della TB in Europa.

Lo studio della TB risale a *Il canone della medicina* scritto da Avicenna nel X secolo. Fu il primo medico a identificare la TB polmonare come una malattia infettiva, il primo a riconoscerne l'associazione col diabete ed il primo a suggerire che si potesse diffondere attraverso il contatto con il suolo e l'acqua (10,11). Sviluppò inoltre il metodo della quarantena per limitare la diffusione della TB (12).

Indicazioni interessanti sull'andamento della malattia sono fornite da un curioso rituale, le cui origini si rintracciano intorno all'XI secolo in Francia e in Inghilterra e che perdura nei secoli successivi, chiamato "toccatura" della scrofola. La pretesa investitura divina del potere reale rendeva possibile una manifestazione pubblica di essa, nel corso di una cerimonia durante la quale il sovrano dimostrava i suoi presunti poteri taumaturgici. Secondo questo rituale il re doveva toccare il malato, in particolare le lesioni nodulari ed ulcerate riconducibili ad un'infezione linfoghiandolare del collo di origine tubercolare, denominata "scrofola", facendo il segno della croce e donando al suddito sofferente una moneta d'oro. Le registrazioni relative a queste donazioni indicano che tra l'XI e il XVI secolo l'andamento della malattia si mantenne costante, con un'incidenza piuttosto bassa, mentre con l'inizio del XVII secolo si registrò

un'improvvisa impennata dei casi. Le cause di questo aumento sono da ricercarsi principalmente nell'urbanizzazione che accompagnò il periodo e nei fenomeni ad esso correlati. Secondo una stima, il tasso di mortalità per TB alla metà del 1600 a Londra era del 15%, mentre a metà del 1700 risultava raddoppiato.

Una ricerca particolarmente esauriente è stata recentemente compiuta su 168 mummie naturali ritrovate nelle cripte della chiesa dei Domenicani di Vác in Ungheria. L'insieme delle informazioni ottenute attraverso ricerche in archivio, esami radiografici e analisi del DNA antico, ha fornito una prova eloquente dell'endemicità della TB anche tra gli ungheresi dei secc. XVIII e XIX. A partire dalla metà del XVII secolo la TB divenne endemica in l'Europa, tanto da attirare l'attenzione dei medici dell'epoca, che si applicarono allo studio della malattia, non comprendendo ancora però che le diverse manifestazioni cliniche erano il risultato di un unico processo infettivo; Nonostante fosse già stabilito dal Dottor Richard Morton nel 1689 che la forma polmonare era associata con dei *tubercoli* (13,14), a causa della varietà dei suoi sintomi, la TB non venne identificata come una singola malattia fino al 1820 circa, e non venne chiamata *tubercolosi* fino al 1839 da Johann Lukas Schönlein (15). Durante gli anni 1838-1845, il Dottor John Croghan, proprietario della Mammoth Cave, portò un gruppo di infetti di TB nella caverna sperando di curarli dalla malattia con la sua temperatura costante e la purezza dell'aria, ma senza risultati poiché morirono tutti entro un anno (16).

Agli inizi del XIX secolo la TB rappresentava la più comune causa di morte per singole malattie; in Inghilterra, ad esempio, il tasso di mortalità annuale per TB si aggirava intorno ai 400-500 casi su 100.000 abitanti. Nel 1815, una morte su quattro in Inghilterra era causata dalla consunzione; entro il 1918 una morte su sei in Francia era ancora causata dalla TBC. Il picco massimo nell'incidenza e nella mortalità annuale della popolazione pari all'1% si raggiunsero in alcune città in Gran Bretagna e negli Stati Uniti intorno al 1850.

Negli anni più recenti (approssimativamente 180 anni fa), coincidenti con la esplosione della popolazione umana e la rivoluzione industriale, i *lineages* di patogeni associati agli uomini si espandettero fortemente. Questi risultati rivelarono notevolmente la parallela evoluzione demografica tra umani e uno dei loro patogeni primari. Con l'uso di marker genetici come le sequenze ripetute in tandem, gli autori hanno dimostrato che il *M. tuberculosis complex* (MTBC) consisteva in due clade indipendenti, uno composto esclusivamente dal *lineage* di *M. tuberculosis* di derivazione umana e l'altro composto da isolati sia animali che umani. Quest'ultimo probabilmente è derivato anch'esso da un *lineage* di un patogeno umano, supportando così l'ipotesi di un nuovo ospite umano. Queste scoperte svelano la dimensione dinamica dell'associazione tra ospite umano e popolazioni patogene (17).

Il primo sanatorio per la TB aprì nel 1859 a Görbersdorf, in Germania (oggi chiamata Sokołowsko e compresa nel territorio polacco), di proprietà di Hermann Brehmer (18).

Per la definizione univoca della malattia bisogna quindi aspettare il 1882 e la scoperta da parte di Koch del micobatterio. Questo ricevette il Premio Nobel per la medicina nel 1905 per tale conquista (19). Koch non credeva che la TB bovina (del bestiame) e quella umana fossero simili, il che ritardò il riconoscimento del

latte infetto come fonte di infezione. Più tardi questa fonte venne eliminata dal processo di pastorizzazione. Koch annunciò un estratto in glicerina del batterio della TB come "rimedio" per la TB nel 1890, chiamandolo *tubercolina*. Non era efficace, ma venne adottato in seguito come test per la TB pre-sintomatica (20).

Dopo la certezza nel 1880 che la malattia era contagiosa, la TB venne resa in Gran Bretagna una malattia "*con obbligo di notifica*", cioè una malattia che deve essere portata a conoscenza delle autorità competenti; vennero così diffuse campagne contro lo sputare in luoghi pubblici, e gli infetti vennero "incoraggiati" a entrare in sanatori che ricordavano prigioni; i sanatori per le classi medio-alte offrivano eccellenti cure e una costante osservazione medica. Qualunque fossero i supposti benefici dell'aria fresca e del lavoro manuale nei sanatori, persino sotto le migliori condizioni, il 50% delle persone entrate morirono entro cinque anni (1916) (18).

La promozione di francobolli natalizi iniziò in Danimarca durante il 1904 come mezzo per raccogliere fondi per programmi contro la TB. Essa si estese agli Stati Uniti e al Canada nel 1907-1908 per aiutare l'*Associazione Nazionale della Tuberculosis* (rinominata in seguito *Associazione Americana dei Polmoni*).

Negli Stati Uniti la preoccupazione della diffusione della TB giocò un ruolo nel movimento per proibire lo sputare in pubblico, salvo usare le sputacchiere.

In Europa le morti da TBC crollarono da 500 ogni 100.000 casi nel 1850 a 50 ogni 100.000 casi nel 1950. Miglioramenti nella salute pubblica ridussero la TB ancor prima dell'arrivo degli antibiotici, anche se la malattia rimase una considerevole minaccia alla salute pubblica, tanto che quando il *Medical Research Council* (consiglio medico della ricerca) venne formato nel Regno Unito nel 1913, il suo scopo principale era la ricerca sulla TB (21). Dopo questa data l'epidemia iniziò un progressivo rallentamento, che continuò in maniera costante nella seconda metà del XIX e per tutto il XX secolo. Le cause di questo declino, apparentemente spontaneo, della malattia, che conobbe una nuova, temporanea crescita solo nei periodi successivi alle due guerre mondiali, non sembrarono facilmente identificabili.

Il primo vero successo nell'immunizzazione contro la TB venne sviluppato da un ceppo attenuato di TB bovina da Albert Calmette e Camille Guérin ottenuto attraverso una serie di passaggi in terreno di coltura durati molti anni a partire dal 1908 (22). Era chiamato "BCG" (Bacillo Calmette-Guérin). Il vaccino BCG venne utilizzato per la prima volta sugli umani nel 1921 in Francia (23), ma solo dopo la seconda guerra mondiale ricevette un ampio consenso negli Stati Uniti, nel Regno Unito e in Germania (24).

Solo a seguito del 1946, con lo sviluppo dell'antibiotico streptomina, il trattamento risultò efficace e una cura divenne quindi possibile. Prima dell'introduzione di questa medicina, l'unico trattamento oltre ai sanatori erano gli interventi chirurgici, compreso la tecnica del pneumotorace, in cui si faceva collassare un polmone infetto per farlo "riposare" e permettere la guarigione delle lesioni; ciò comportò un beneficio minimo, tanto che venne interrotta a partire dal 1950 (25).

La scoperta della cura contro tale malattia e lo sviluppo di test di screening economici (test cutaneo, raggi X al torace) per individuare le persone affette da TB, resero per la prima volta possibile pensare che la TB potesse essere eradicata. Infatti la regressione cominciò quando ancora le cause della TB non erano state ancora ben identificate, mentre l'introduzione di terapie farmacologiche efficaci (streptomina e rifampicina) fu posteriore al 1950. L'ipotesi più probabile era che nel declino dell'epidemia di TB siano intervenuti fattori di tipo ambientale. L'utilizzo di abitazioni più confortevoli, le migliorate condizioni di lavoro e di vita e una più alta qualità nell'alimentazione, hanno probabilmente diminuito il rischio di esposizione all'infezione, migliorato l'incidenza di malati di TB e aumentato la resistenza dell'ospite, almeno nei paesi sviluppati. Una perdita di virulenza del batterio però non poteva essere del tutto esclusa.

Negli Stati Uniti, in Inghilterra e Europa programmi di prevenzione per la salute pubblica aventi l'obiettivo di eliminare la TB ebbero inizio e vennero perseguiti con tenacia. La diffusione dello screening sulla popolazione quindi identificava con certezza gli individui affetti da TB. Una persona a cui veniva diagnostica la TB era costretta per legge ad accettare i trattamenti e rischiava di essere arrestata nel caso rifiutasse le cure. I lavoratori del servizio sanitario erano assunti per monitorare che i pazienti con TB venissero curati con criteri ambulatoriali e che assumessero i medicinali regolarmente durante tutto il periodo prescritto. Queste misure ebbero successo nel diminuire il numero di nuovi casi di TB che si dimostrò il più basso di tutti i tempi. Sebbene la TB sparisse velocemente nei paesi sviluppati, essa rimase la maggior causa di morte nei paesi in via di sviluppo. Nei primi anni '70 la maggior parte dei programmi contro la TB furono smantellati e i fondi destinati in precedenza a tale scopo furono reindirizzati verso ciò che ai tempi sembrava destare maggiore attenzione e urgenza riguardo la salute della popolazione. Nelle successive decadi i casi di TB continuarono a diminuire, ma improvvisamente a metà degli anni '80 iniziarono, in alcuni paesi, a riemergere nuovi episodi. La speranza che la malattia potesse essere definitivamente sconfitta è stata schiacciata dall'insorgenza di ceppi resistenti agli antibiotici in questi anni. Un fattore che contribuì a questo incremento fu l'immigrazione massiccia. Altro fattore importante furono le condizioni di sovraffollamento dei rifugi dei senza tetto, nelle prigioni e la presenza in queste dimore di tossicodipendenti e sieropositivi.

Per esempio, i casi nella Gran Bretagna di TB, attorno ai 117.000 nel 1913, erano crollati a circa 5.000 nel 1987, ma sono risaliti, raggiungendo i 6.300 casi nel 2000 e i 7.600 casi nel 2005 (26). Il numero di coloro che non riescono a completare il ciclo di farmaci è elevato. New York ha avuto a che fare con più di 20.000 pazienti TBC "non necessari" con ceppi multiresistenti (resistenti, perlomeno, a entrambe Rifampicina e Isoniazide). Il risorgere della TB ha causato la dichiarazione dello stato di emergenza globale della salute pubblica da parte della Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1993 World Health Organization (WHO) (27).

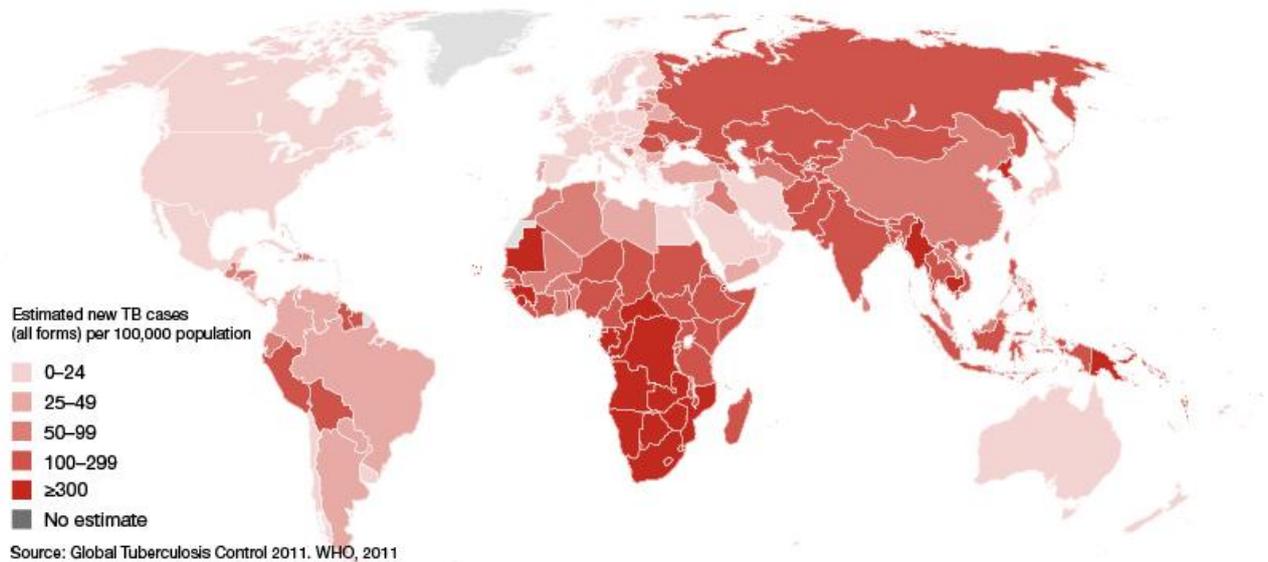
La riemergenza di TB fu sufficiente per destare, per l'ennesima volta, grande attenzione, in quanto i nuovi scenari erano spaventosamente differenti rispetto ai precedenti. I nuovi ceppi circolanti di micobatteri che davano luogo ad infezioni primarie risultarono essere resistenti ad uno o più farmaci antitubercolari.

A scatenare il panico tra il personale sanitario fu l'incremento del numero di vittime fino al 50% di individui non trattati con adeguata terapia e la paura che questi ceppi farmaco resistenti potessero diffondersi ad ampio raggio. Nonostante la recrudescenza di casi di TB e la concomitante insorgenza di ceppi resistenti, si sarebbe potuto predire sulla base delle condizioni osservate nei quartieri poveri; medici e funzionari della sanità pubblica furono colti in uno stato di completa impreparazione (1).

A seguito dello smantellamento dei programmi antiTB, la TB fu ampiamente dimenticata dalla comunità medica. In molti ospedali, medici alle prime armi non furono ben istruiti riguardo la diagnosi e cura della TB o venne dato loro solo un rapido accenno introduttivo alla malattia. La ricerca in campo della TB si ridusse drasticamente e minimi tentativi furono intrapresi per un vaccino efficace. A rendere la situazione ancora più complicata fu la convinzione delle industrie farmaceutiche che la TB fosse ormai una malattia archiviata nel passato nei paesi sviluppati, tanto da non considerare tali aree un mercato lucrativo sufficiente; sospesero quindi l'impegno della ricerca di nuovi farmaci antiTB e smisero di produrre i farmaci già testati. Così, in contrasto con altre malattie batteriche dove l'insorgenza di ceppi resistenti poteva essere compensata da nuovi antibiotici entrati sul mercato, non ci furono subito a disposizione nuovi farmaci antitubercolari in via di sviluppo. Questo comportò seri problemi poiché la messa a punto di un farmaco di nuova generazione avrebbe potuto comportare un lasso temporale necessario di circa 20 anni dal momento della scoperta all'entrata sul mercato (1).

L'emergere però di TB multiresistente introdusse di nuovo l'operazione chirurgica come parte integrante del trattamento per queste infezioni. La rimozione delle cavità del torace riduceva il numero di batteri nei polmoni, e incrementava l'esposizione dei restanti batteri al flusso sanguigno, provocando in teoria un incremento dell'efficacia della terapia combinata con chemioterapici (28).

Oggi giorno sulla base dei più recenti rapporti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, si stima che un terzo della popolazione mondiale abbia contratto un'infezione da *M. tuberculosis* e che nel 2011 ci siano stati circa 9 milioni di nuovi casi di infezione tubercolare, di cui 1,1 milioni in pazienti con infezione da HIV, principalmente nei paesi in via di sviluppo (Sud America, Estremo Oriente, Africa centro-meridionale) (29,30) (Figura3). Negli ultimi due decenni la tendenza al continuo decremento dei casi di TB nei paesi industrializzati ha subito un netto rallentamento. Questo fenomeno, inizialmente attribuito al diffondersi dell'epidemia da HIV, è oggi sostenuto in particolari dai casi in migranti provenienti da paesi ad alta incidenza. In Italia, in base ai dati dei pazienti sottoposti a notifica nel 2008 i tassi di incidenza della TB sono pari a 7,66 per 100.000 abitanti e il tasso di mortalità (escludendo i pazienti con infezione da HIV) è pari allo 0,7 per 100.000 abitanti. Nello stesso anno il 3,7% dei casi era provocato da TB multi resistente (*Multi Drug Resistant Tuberculosis*, MDR-TB) (31).



**Figura 3 - Tassi di incidenza della TB a livello globale aggiornato all'anno 2010 (32).**

### **1.1.2 M. tuberculosis Complex**

I micobatteri appartengono al genere *Mycobacterium* (dal greco μυκηζ: micete e βακτηριου: bastoncino), classe *Schizomycetae*, ordine *Actinomycetales*, famiglia *Mycobacteriaceae*. Il genere comprende parassiti obbligati, saprofiti e forme intermedie. *M. tuberculosis* è l'agente eziologico della TB, individuato per la prima volta da Robert Koch nel 1882; tale patologia è un'antica malattia polmonare cronica che ha accompagnato la storia dell'uomo negli ultimi millenni. I micobatteri sono ubiquitari in natura, in quanto la loro presenza è stata riscontrata nelle acque, nel suolo, negli alimenti e come ospiti di varie specie animali. *M. tuberculosis* appartiene al gruppo *M. tuberculosis complex* (MTBC), di cui fanno parte anche *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*. Per l'elevata omologia nucleotidica il gruppo MTBC oggi è considerato come una singola specie e di conseguenza i suoi componenti come sottospecie. Oltre a questo, non si può ignorare la recente espansione della tassonomia e dei quadri clinici associati a specie micobatteriche non tubercolari (MOTT: *Mycobacterium Other Than Tubercle bacilli*) tanto che, al momento attuale, le specie MOTT descritte in letteratura assommano a più di 80 (33). In particolare *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. africanum* sono gli agenti eziologici della malattia tubercolare esclusivamente nell'uomo. *M. bovis* invece ha uno spettro d'ospite molto ampio nel regno degli animali potendo infatti infettare bovini, antilopi, foche, elefanti, leoni. In rari casi può infettare anche l'uomo nella situazione in cui abbia ingerito degli alimenti contaminati (es. latte) di bovini infetti. *M. microti* infine è l'agente eziologico della TB nei roditori e non è patogeno per l'uomo (Tabella 1).

**Tabella 1 - Classificazione dei micobatteri nei gruppi principali e patologia associata (34,35).**

| <b>Classificazione</b>   | <b>Patologia</b>  |
|--|---|
| <i>M. tuberculosis complex</i> (MTBC):<br><i>M. tuberculosis</i> , <i>M. canettii</i> ,<br><i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. microti</i> | Tubercolosi   |
| <i>M. leprae</i>   | Malattia di Hansen o Lebbra   |
| Micobatteri non tubercolari (MOTT)   | Malattie polmonari croniche, linfadeniti,<br>infezioni cutanee croniche, infezioni croniche |

### **1.1.3 Caratteristiche di *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* è senza dubbio uno dei più antichi complessi ed evoluti agenti infettivi per l'uomo, verso il quale ha sviluppato nel corso dell'evoluzione sofisticati meccanismi per evadere la risposta immunitaria dell'ospite a per trarre vantaggio dalla stessa.

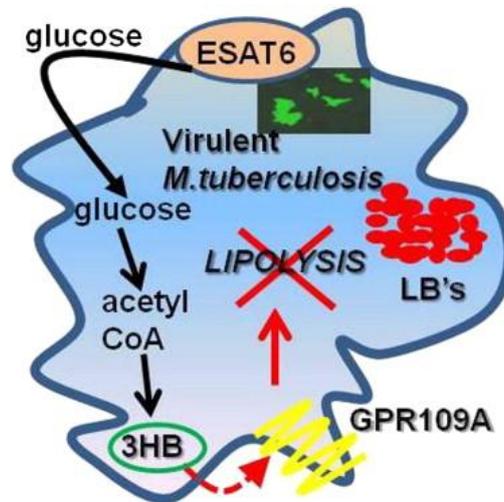
Una delle principali caratteristiche di *M. tuberculosis* risiede nella resistenza all'azione battericida dei macrofagi mediante un meccanismo che prevede l'inibizione della fusione del lisosoma-fagosoma. Il micobatterio infatti rimane in un vacuolo non acidificato, nel quale sono assenti gli enzimi e le molecole ad azione microbicida e dove è in grado di replicarsi attivamente.

*M. tuberculosis* per definizione è un bacillo asporigeno, privo di ciglia e di capsula e appare al microscopio come un bastoncello immobile di piccole dimensioni (1-4 x 0,3-0,6 µm), dritto o leggermente incurvato (36). In linea generale sono pleomorfi e durante la crescita possono mostrare ramificazioni o formazioni di filamenti; contrariamente agli attinomiceti, i filamenti dei micobatteri possono frammentarsi e dare origine ad elementi bastoncellari o coccoidi; in nessun caso però si ha la formazione di un vero e proprio micelio.

*M. tuberculosis* è un aerobio stretto ed, infatti, gli organi più colpiti nelle disseminazioni metastatiche appaiono quelli in cui la pressione parziale di ossigeno è più elevata, quali gli apici polmonari ed i reni. Presenta un *optimum* di temperatura a 37°C e si dimostra sensibile al calore, soprattutto umido (in autoclave a 120°C viene ucciso in pochi minuti), ma non al freddo (si mantiene vitale per diversi giorni a +4°C e per alcuni mesi a -75°C); possiede una notevole resistenza all'essiccamento soprattutto se al riparo dalla luce solare.

I fattori di virulenza e le proteine associate al micobatterio non sono ancora del tutto ben definite, ma si ipotizza un coinvolgimento di proteine codificate dalla regione di differenza 1 (RD1). Tale regione è un frammento di genoma di 10,7 kb che codifica per numerosi geni tra cui Esat-6 e cfp10 ed è assente nel ceppo vaccinicco *M. bovis* BCG; è stato infatti dimostrato come l'attenuazione di quest'ultimo sia dovuta all'assenza di RD1. L'inserimento della stessa regione nel genoma di BCG ricombinante ne provoca invece un diretto aumento della virulenza. La proteina ESAT-6 (Figura 4) codificata per l'appunto dalla regione RD1, è stato

suggerito essere in grado di produrre pori sulle membrane dei vacuoli del macrofago in cui il micobatterio si moltiplica, permettendo così la fuoriuscita e diffusione dello stesso nella regione circostante.



**Figura 4 - Azione della proteina ESAT-6 (37).**

Infine la regione RD1 che codifica per le proteine appena citate, è stato osservato essere coinvolta anche per la codifica di altre proteine implicate nell'apparato secretorio. Tale secrezione di proteine e antigeni attraverso la membrana rappresenta un potente ed efficace sistema per interferire con i meccanismi di difesa dell'ospite. Anche per *M. tuberculosis* questo processo promuove l'azione patogena e assicura la moltiplicazione nei tessuti dell'ospite. Oltre ai sistemi di secrezione delle proteine ESAT-6 e CFP-1, due tra gli antigeni più immunogenici di *M. tuberculosis* usati nella diagnosi diretta di TB, tale micobatterio presenta altri sistemi di secrezione quali Sec e TAT.

Il sistema Sec è coinvolto nella secrezione della superossido dismutasi, un enzima che consente al micobatterio di rendere meno battericida l'ambiente all'interno del fagolisosoma. Ceppi per i quali il sistema secretorio Sec è inattivato geneticamente risultano essere fortemente attenuati.

Tat è un pathway Sec-indipendente, alternativa che è conosciuta come una traslocazione che sfrutta twin-arginine; essa è implicata nel trasporto di proteine, già configurate e correttamente ripiegate, al periplasma. Tali sistemi mediano anch'essi il trasporto delle proteine attraverso la membrana plasmatica.

Un paradigma centrale dell'immunologia è che le cellule linfocitarie di tipo T riconoscono antigeni peptidici presentati nel contesto del complesso maggiore di istocompatibilità. E' stato recentemente rilevato che una sottoclasse di linfociti T può individuare antigeni non peptidici, in presenza di *antigen presenting cells* (APC) che esprimano CD1, definiti acidi micolici (38).

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

*Thermomonospora*. È noto che componenti non proteiche della parete cellulare di *M. tuberculosis* intervengono nel meccanismo di patogenicità e tra questi un ruolo importante viene svolto dagli acidi micolici che sono delle complesse strutture molecolari di acidi grassi a lunga catena ramificati in posizione  $\alpha$  e con un ossidrilico in posizione  $\beta$ . Le catene hanno grandi dimensioni fino a 70-90 atomi di carbonio. Quelli più semplici sono costituiti da due catene, una lunga fino a 60 atomi di carbonio (distale) e una più corta (prossimale). *M. tuberculosis* produce 5 tipi di acidi micolici, che differiscono soprattutto per la presenza e la natura dei sostituenti contenenti ossigeno nella porzione distale del ramo meromicolato e sono in grado di organizzarsi in strutture complesse tramite legami covalenti con arabinogalattani o altri zuccheri. Gli acidi micolici sono orientati perpendicolarmente al piano della membrana e formano una speciale barriera lipidica responsabile di molti aspetti della fisiologia e della patogenicità di *M. tuberculosis*.

Andando più nello specifico nella parete cellulare (*cell wall*) si identificano due segmenti: inferiore e superiore. La porzione inferiore, più interna, è denominata *core* ed è costituita dal complesso micol-arabinogalattan-peptidoglicano (mAGP). Si tratta di un peptidoglicano (PG) legato covalentemente ad un galattosio lineare, a sua volta legato a diverse file di arabinofurani connessi agli acidi micolici (39-41).

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

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

Diversi studi hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione tra la presenza di SLs negli isolati di *M. tuberculosis* e la virulenza del microrganismo. I ceppi più virulenti elaborano grandi quantità di lipidi acidi, tra cui SLs, mentre i ceppi attenuati sono privi di questi componenti. Goren ha dimostrato che i sulfolipidi sono implicati nella fusione fagosoma-lisosoma (42).

Il fattore cordale, noto anche come Trealosio Dimicolato (TDIM), responsabile della particolare disposizione delle colture di molti ceppi di bacilli tubercolari, è immunogeno e stimola la formazione dei granulomi. Presenta una attività immunostimolatoria, in quanto favorisce la secrezione di citochine ed è strettamente coinvolto nel meccanismo di patogenesi che genera nel danno tissutale tipico della malattia tubercolare. Partecipa anche nella protezione da stress ambientale contribuendo alla bassa permeabilità della parete cellulare che conferisce una naturale resistenza ai farmaci, nella protezione da stress ossidativi e nella permanenza del patogeno nei tessuti dell'ospite.

La porzione esterna della parete è ricca di glicolipidi complessi e fenolici. Ad esempio il ftiocerolo dimicocerosato (DMI), esso è una cera non polare, rilasciata dalla cellula; ciò rende ragione della denominazione del bacillo tubercolare come "*ball of wax*"; i ceppi di *M. tuberculosis* poveri di DIM presentano una parete cellulare più permeabile. I PIMs sono costituiti da fosfatidilinositolo, che lega a sé da

una a sei molecole di mannosio (solitamente due). E' stato dimostrato che i lipomannani (LM) ed i lipoarabinomannani (LAM) sono estensioni dei PIMs. Il LAM svolge molte azioni immunomodulanti, contribuendo in questo modo alla patogenesi delle manifestazioni cliniche: blocca diverse funzioni indotte da IFN- $\gamma$  tra cui l'attività microbica dei macrofagi, inibisce l'attività della protein chinasi C (PKC) e stimola la produzione di molte citochine associate ai macrofagi come Tumor Necrosis Factor (TNF) di tipo  $\alpha$  e Interleuchine (IL) di tipo 1, IL-6 e IL-10 (43).

Nel contesto della parete cellulare è possibile riconoscere anche proteine; alcune di queste rappresentano l'antigene responsabile dell'ipersensibilità di tipo ritardato dimostrabile nei soggetti infettati. Infine, polisaccaridi capsulari tra cui un  $\alpha$ -1,4 glucano, un arabinomannano ed un mannano sono stati individuati all'esterno della cellula. A conferma di quanto finora detto possiamo notare che quando la parete cellulare è distrutta, ad esempio per azione di vari solventi, i lipidi liberi, le proteine, il LAM, ed i PIMs sono solubilizzati mentre il complesso mAGP rimane come residuo insolubile. Si può quindi affermare che questi lipidi, proteine e lipoglicani siano delle molecole effettrici mentre il *core* insolubile è essenziale per la vitalità della cellula (Figura 5 e 5 bis).

La conoscenza delle proprietà della parete cellulare rende ragione di molti aspetti microbiologici e patogenetici di *M. tuberculosis* quali le piccole dimensioni, l'idrofobicità, l'alcol-acido resistenza, la lenta crescita e la resistenza a diversi antibiotici.

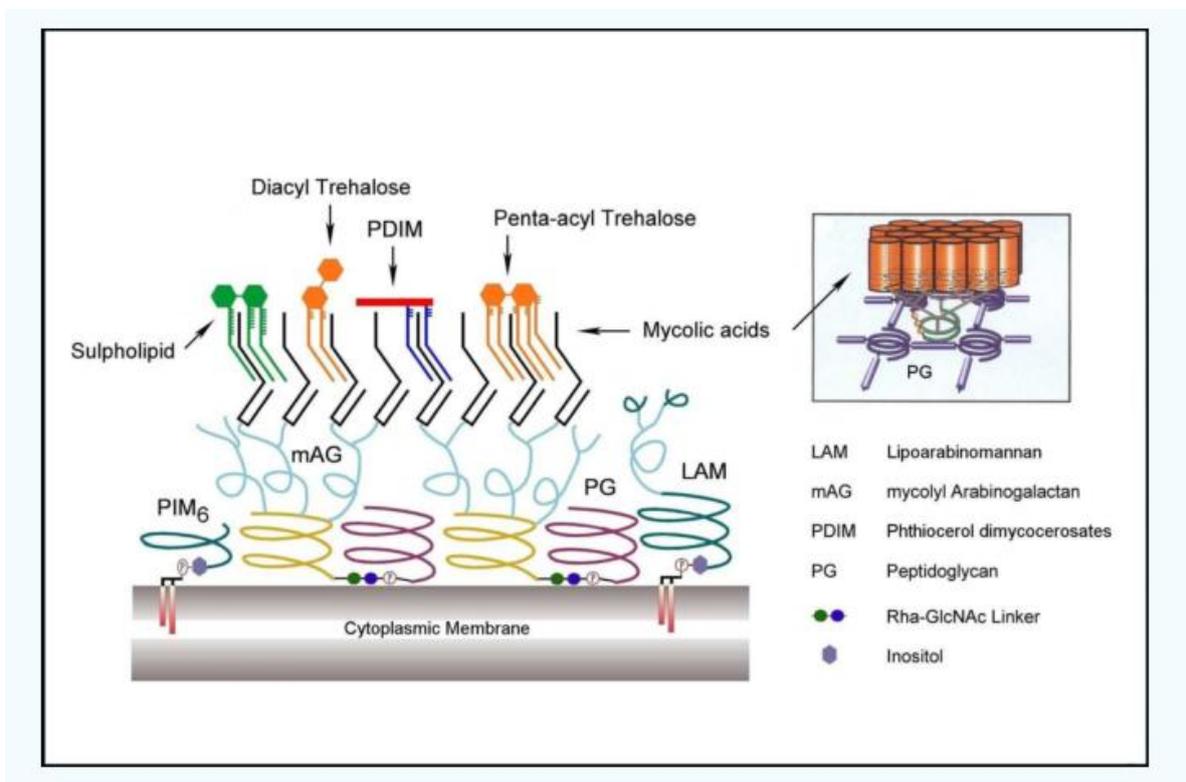
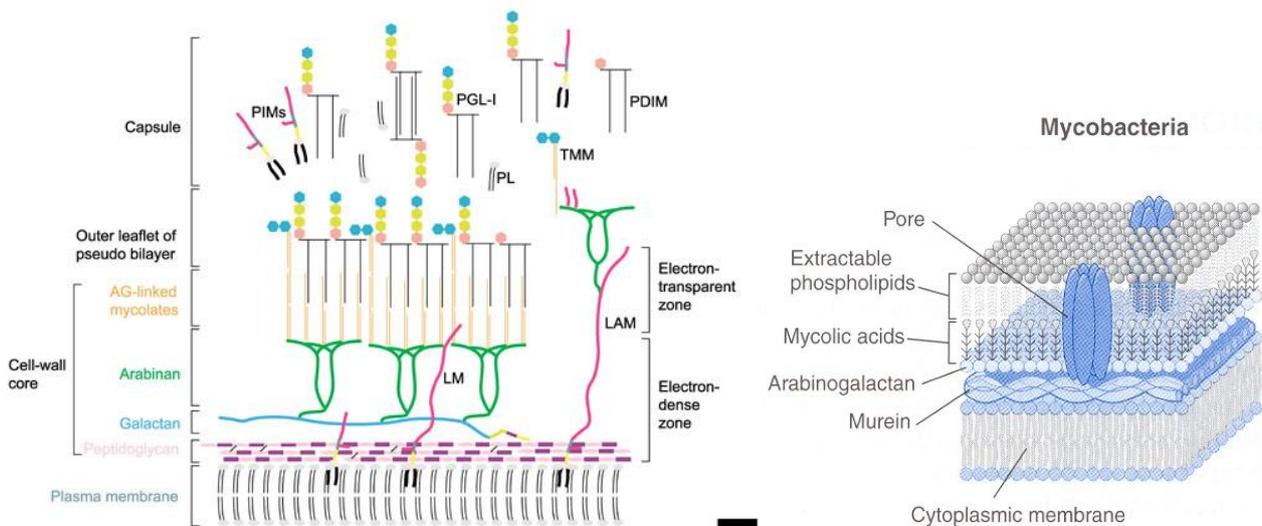


Figura 5 - Composizione della parete micobatterica (44).



**Figura 5 bis - Composizione della parete micobatterica (45).**

Per quanto concerne l'alcol-acido-resistenza, essa è la principale caratteristica tintoriale dei micobatteri e può essere evidenziata con la colorazione selettiva di Ziehl-Neelsen. Questa tecnica richiede di trattare il preparato per 2-3 min con una soluzione di fucsina addizionata di acido fenico riscaldando il vetrino fino a che la soluzione del colorante emetta dei vapori visibili, lavare con acqua e decolorare per 30-60 secondi con una soluzione di acido cloridrico (HCl) al 3% in alcol etilico, infine eseguire una colorazione di contrasto con blu di metilene. Solo i micobatteri mantengono il colore rosso della fucsina dopo il trattamento mentre tutti gli altri materiali vengono decolorati e ricolorati in blu dalla colorazione di contrasto; i micobatteri sono quindi facilmente apprezzabili come bacilli rossi in campo blu. L'acido resistenza è dovuta alla formazione di aryl-metano-micolati tra la fucsina e gli acidi micolici presenti negli involucri cellulari nonché ai complessi che si formano tra il colorante e varie strutture superficiali o intracellulari del batterio e che ancorano saldamente il colorante impedendone l'asportazione da parte del decolorante (alcol-acido). Le colonie di micobatteri possono presentare una pigmentazione di colore variabile dal giallo all'arancione intenso, dovuta alla produzione di carotenoidi. Secondo la classificazione di Runyon (Figura 6), le specie che possiedono questa proprietà si distinguono in "fotocromogene" per le quali la formazione del pigmento richiede la luce e "scotocromogene" per le quali il pigmento si forma sia alla luce che al buio; esistono anche specie nelle quali la pigmentazione è assente o sporadica e sono definite "non cromogene". In generale i micobatteri possono essere suddivisi in due gruppi principali: "a crescita lenta" (crescita di colonie dopo 7 giorni) e "a crescita rapida" (crescita in meno di 7 giorni) (46).

## Gruppo non-Runyon

*M. tuberculosis*  
*M. bovis*  
*M. bovis BCG*  
*M. africanum*  
*M. leprae*

## Gruppi Runyon

|   |  |
|---|--|
| <b>GRUPPO I</b><br>crescita lenta, fotocromogeni      | <i>M. kansasii</i><br><i>M. marinum</i><br><i>M. simiae</i>  |
| <b>GRUPPO II</b><br>crescita lenta,<br>scotocromogeni | <i>M. scrofulaceum</i><br><i>M. paratuberculosis</i><br><i>M. szulgai</i><br><i>M. xenopi</i>  |
| <b>GRUPPO III</b><br>crescita lenta, non cromogeni    | <i>M. avium</i><br><i>M. intracellulare</i><br><i>M. genavense</i><br><i>M. haemophilum</i><br><i>M. malmoense</i><br><i>M. ulcerans</i> |
| <b>GRUPPO IV</b><br>crescita rapida                   | <i>M. fortuitum</i><br><i>M. chelonae</i><br><i>M. abscessus</i>   |

Figura 6 - Classificazione di Runyon.

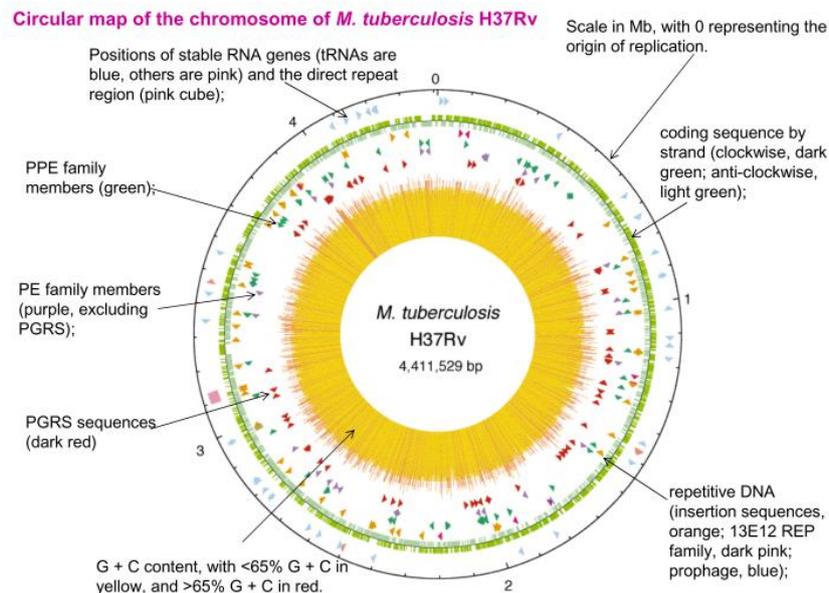
La parete cellulare, inoltre, conferisce alla cellula un particolare atteggiamento funzionale caratterizzato da lenti scambi metabolici da cui dipende il ridotto ritmo di replicazione (15-20 ore in contrasto con la singola ora sufficiente alla crescita della maggior parte dei batteri): ne deriva che lo sviluppo microbico di una coltura primaria è apprezzabile solo dopo alcune settimane (da 3 a 6) di incubazione a 37°C a pH 6.4-7.0. La crescita è stimolata dall'incubazione in atmosfera addizionata al 5-10% di CO<sub>2</sub>. Nei materiali organici si presenta isolato o a coppie, con disposizioni a L o a V oppure in piccoli ammassi, simili a cordoni, nei quali i bacilli mostrano un orientamento parallelo. *M. tuberculosis* dà origine a colonie secche che facilmente si disperdono nell'aria dei laboratori di analisi se non vengono adottati idonei accorgimenti e protezioni.

Il bacillo di Koch non cresce sui comuni terreni, ma solo su quelli arricchiti con sostanze complesse. Si possono utilizzare terreni a base di tuorlo d'uovo: sono molto sfruttati per l'isolamento primario e sono disponibili in numerose formulazioni. Essi consistono in genere in una miscela di soluzione tampone e giallo d'uovo, fatta coagulare a becco di clarino in provette tenute per qualche tempo a 65-70°C. Questi terreni contengono anche varie concentrazioni di verde malachite per impedire lo sviluppo di specie microbiche sfuggite ai processi di decontaminazione iniziale del prodotto morboso in esame e l'aggiunta di glicerolo (per favorire lo sviluppo di *M. tuberculosis*) o piruvato (per favorire lo sviluppo di *M. bovis*). Tra questi ricordiamo i terreni solidi di Lowenstein-Jensen (uova, sali, glicerolo, patata e verde malachite) e di Petraghani (uova, patata, latte, glicerolo e verde malachite). Esistono anche terreni a composizione chimica definita: sono costituiti da una soluzione tampone di base arricchita con acido oleico (come sorgente di lipidi), albumina bovina, destrosio e catalasi solidificati con agar o mantenuti allo stato liquido. Nei terreni liquidi e nel caso di micobatteri virulenti è ben evidente la tendenza a crescere in formazioni cordali costituite da numerosi bacilli allineati in lunghe file parallele: questa caratteristica è in funzione delle proprietà idrofobiche della superficie cellulare per l'alto contenuto in lipidi e, in particolare, della presenza dei derivati degli acidi micolici già denominati appunto come fattore cordale (47).

Concludendo, la comprensione della natura del *cell wall* è estremamente importante perché ad esempio mette in luce il meccanismo d'azione di alcuni dei più efficaci farmaci antitubercolari. Nel caso specifico di isoniazide ed etambutolo possiamo osservare che essi inibiscono la sintesi di alcuni componenti della parete, rispettivamente gli acidi micolici e l'arabinano favorendo così l'azione del farmaco sul micobatterio.

#### 1.1.4 Genoma di *M. tuberculosis*

Nel 1998 è stato completato il sequenziamento del genoma di *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 7) ceppo di riferimento per analisi di biologia molecolare. Il genoma è costituito da 4411529 paia di basi (pb) per il 65,6% costituito da G+C; esso codifica per 3986 proteine (di cui solo il 56% con funzione definita). Oltre il 51% dei geni è derivato dalla duplicazione genica e 50 geni codificano per RNA stabile; infine il 3,4% del genoma è composto da sequenze di inserzione e profagi.



**Figura 7 - Mappa circolare del genoma di *M. tuberculosis* H37Rv (48).**

Più recentemente è stato completato il genoma di un ceppo clinico di *M. tuberculosis* CDC1551 e quello di un ceppo appartenente alla famiglia *M. bovis* (49).

Nel complesso è stato osservato che *M. tuberculosis* presenta un maggior numero di geni rispetto a quanto osservato per altri batteri patogeni, un metabolismo complesso e può essere considerato una specie geneticamente stabile con poca variabilità genetica. Analisi di genomica comparativa tra vari ceppi di MTBC hanno permesso di individuare regioni in cui vi sono maggiori differenze tra i ceppi, tali da poter definire in modo corretto i rapporti genetici ed evolutivi tra le varie specie e sottospecie. È stato quindi possibile costruire un albero genealogico all'interno di MTBC e dimostrare come le varie sottospecie si siano evolute attraverso un processo di delezione genica in cui i frammenti di genoma, anche di diverse decine di kb, sono andati persi.

### 1.1.5 Principi generali dell'evoluzione batterica

Esiste in natura una pressione evolutiva significativa ad opera di più piccoli genomi batterici, come corti cromosomi che replicano più velocemente, il che comporta una rapida crescita dei batteri ed il loro diffondersi a partire da antenatori con cromosomi più lunghi. Se la popolazione batterica si muove in un ambiente dove, per esempio, un amminoacido essenziale è abbondante, alcuni membri della popolazione batterica, dopo molte generazioni, perderanno l'abilità di sintetizzare quell'amminoacido. Alla fine, ogni membro della popolazione perderà anche mediante delezione della sequenza del DNA codificante il percorso necessario per la codifica dell'amminoacido. Tuttavia tale processo accade molto lentamente e la pressione evolutiva da un lato riduce la dimensione del genoma ma allo stesso tempo necessita di proteggere l'organismo dall'estinzione dovuta alla degenerazione stessa del proprio genoma (50).

Se la premessa generale è che le specie batteriche cambino in risposta all'ambiente in cui vivono, è chiaro che ci sono differenti meccanismi molecolari di mutazioni crescita-dipendenti e adattative o mutazioni legate alla fase stazionaria del ciclo di un battere (51). Quando le cellule in crescita sono sottoposte ad un cambiamento nel loro ambiente, esse continuano ad avere capacità metaboliche per una specifica risposta compensatoria. Tuttavia, trascorsi 4-5 giorni senza una fonte esogena di energia, le cellule fanno ricorso a incrementi aspecifici di tutti i tassi di mutazione nel tentativo finale di produrre un mutante in grado di sopravvivere. Le percentuali di mutazione sono soggette anche ad altri fattori, come agenti ossidativi, luce UV, attività di enzimi riparatori di DNA e variabili che possono essere influenzate a loro volta da condizioni di fabbisogno nutritivo.

Sulla base dello studio di 26 geni su 842 isolati di *M. tuberculosis*, più del 95% delle sostituzioni nucleotidiche causano sostituzioni amminoacidiche in geni coinvolti nella resistenza ai farmaci (52). Una particolare mutazione può infatti avvenire in modo indipendente e random oppure, più spesso, in risposta alla somministrazione ad un farmaco (es. isoniazide). La mancanza di ossigeno inoltre induce drammatici e specifici cambiamenti nei micobatteri, inclusa anche l'aumentata resistenza ad isoniazide (53). Così accade che il tasso alla quale avvengano le mutazioni sia elevato se sottoposto a condizioni in cui siano necessarie per la sopravvivenza, come se i meccanismi cellulari si siano evoluti per regolarizzare la vita cellulare. La maggior parte dei processi molecolari comportano mutagenesi spontanee e indotte che dipendono dall'azione di particolari enzimi (54). Un accumulo di lesioni al DNA in cellule sotto stress può comportare la saturazione del sistema di riparazione del DNA, ciò può condurre ad un aumento del tasso di mutazione come se avvenisse una down regolazione del sistema di riparazione nelle cellule quiescenti e l'inattivazione degli enzimi che riparano il DNA a causa di una mutazione.

### 1.1.6 Storia dell'evoluzione molecolare di *M. tuberculosis* (55)

L'orologio molecolare è una tecnica utilizzata in evoluzione molecolare per stimare il tempo che è trascorso dalla separazione tra due specie, a partire dallo studio delle differenze esistenti nelle sequenze amminoacidiche di alcune proteine. Tale tecnica si basa sulla ipotesi che mutazioni casuali, con le quali i geni si evolvono, si verificano con frequenze pressoché costanti nel tempo. Considerato valido questo assunto, diventa possibile stimare il tempo trascorso dal momento in cui si è verificata la divergenza tra due specie che discendono dallo stesso antenato comune, semplicemente valutando il numero delle differenze presenti in sequenze di DNA correlate o nelle corrispondenti proteine.

Gli orologi molecolari di marker genetici utilizzati per studiare la diffusione di *M. tuberculosis* differiscono fra loro e possono essere impiegati per analizzare l'evoluzione molecolare su brevi o lunghi periodi di tempo. Studi di pattern, sulla base di variazioni ed evoluzioni di marker genetici differenti intrinsecamente, risultano utili per diverse applicazioni e analisi del modo in cui si verificano queste alterazioni genetiche; queste ultime forniscono informazioni anche riguardo la loro efficacia come target epidemiologici.

I dati di sequenza di vari geni, inclusi 16S rRNA, i geni *rpoB* (gene che codifica per la subunità  $\beta$  della RNA polimerasi) e *hsp65* (heat shock protein) sono stati impiegati per costruire relazioni di tipo filogenetico tra diversi ceppi di micobatteri (56,57). È stato dimostrato che il genoma di *M. tuberculosis* H37Rv possiede 20 citocromi P450 contenenti mono-ossidasi in grado di catalizzare l'ossidazione mista di composti idrofobici. Questa è una attività associata ai liberi saprofiti di terra e ciò forse potrebbe indicare che l'ancestro di *M. tuberculosis* sia stato un micobattere di terra (58).

Fino a poco tempo fa, si riteneva che fossero i bovini a trasmettere la TB agli uomini, dato che la variabilità dell'ospite di *M. bovis* risulta essere più ampia di quella di *M. tuberculosis*. Tuttavia le informazioni genetiche hanno rivelato che accade l'esatto contrario (59).

Gutierrez *et al* hanno condotto una analisi di sequenza di 7 geni per dimostrare che *M. tuberculosis* appare essere un insieme composito di un gruppo relativamente diverso di bacilli tubercolari, che includono anche il ceppo *M. canettii* (60). Perciò visto il generale basso livello di variabilità genetica in *M. tuberculosis*, la popolazione di micobatteri è stato stimato aver preso vita all'incirca tra i 15000 e i 35000 anni fa, risultato di una espansione clonale a seguito di un collo di bottiglia evolutivo (52, 59-61).

### 1.1.7 Strategie per la generazione di variazione genica

L'analisi di variazione genica, o genotipizzazione, è utilizzata per tracciare l'evoluzione di ceppi differenti di *M. tuberculosis*, sia a livello nazionale ed internazionale, così da ottenere informazioni che riguardino la diffusione dei ceppi, il grado di infettività e patogenicità. L'orologio molecolare dei vari elementi usati come marker è differente e può essere sfruttato per poter osservare i cambiamenti durante un periodo di tempo ampio o ristretto. Un marker con un rapido orologio molecolare potrebbe essere richiesto per determinare se una infezione è da considerarsi una riattivazione di una precedente infezione, mentre un marker con un orologio molecolare lento è richiesto per monitorare una evoluzione in un lasso temporale da 10 a migliaia di anni. Gli orologi evolutivi che stimano la distanza evolutiva sono spesso basati sui cambiamenti di una sequenza locale all'interno di uno specifico gene. Nei geni funzionali, le mutazioni letali e fortemente non selettive non possono essere mantenute dalla cellula. Le mutazioni a livello delle sequenze locali è risaputo che colpiscono differenti regioni del DNA con diversa efficacia, limitando così la precisione dell'orologio evolutivo. Studi sui pattern di variazione ed evoluzione di differenti marker genetici sono di grande utilità per molteplici applicazioni e analisi del modo in cui questi cambiamenti avvengono; possono inoltre migliorare ancora di più la loro efficacia per scopi epidemiologici e aumentare la loro precisione.

In generale, le strategie per generare variazioni geniche nei batteri possono essere divisi in tre categorie (54):

- **Piccoli cambiamenti a livello locale nella sequenza nucleotidica del genoma simili Small nucleotide Polymorphism (SNP): piccoli polimorfismi nucleotidici**

Tale strategia è stata osservata per migliorare le funzioni biologiche già presenti nella cellula, ma è improbabile che comportino lo sviluppo completo di nuove funzioni biologiche. Mutazioni silenziose (sinonime o non codificanti) nel DNA sono molto spesso utili per studi evolutivi per come essi esercitano una pressione evolutiva leggera o non selettiva sull'organismo e così possiedono la capacità di essere mantenute attraverso molte generazioni e l'autorizzazione a tracciare le relazioni fra gli organismi ad essi correlati.

- **Riarrangiamenti intragenomici di segmenti di sequenze genomiche**

Possono avvenire come conversioni geniche (o trasferimenti non reciproci) se sequenze correlate nel genoma subiscono una ricombinazione. Questi processi possono risultare come nuove combinazioni ottenute dalla fusione di diversi domini funzionali. Il riassortimento dei segnali di controllo dell'espressione che coinvolgono molti siti di reading frame occupati nella produzione di proteine, possono avvenire in organismi in condizioni migliori e in differenti nicchie ambientali. La duplicazione dei segmenti di DNA come risultato di un riarrangiamento potrebbe servire come substrato per evoluzioni successive (62). La delezione di segmenti di DNA può avvenire ed essere di aiuto, se combinata con la selezione naturale, per rimuovere sequenze non essenziali dal genoma. Tuttavia la pressione evolutiva nel ridurre le dimensioni del genoma può essere di ostacolo per la produzione di una nuova proteina. La maggior parte delle alterazioni mutazionali a carico delle proteine porta ad una riduzione della funzione proteica e quindi alla morte cellulare. Per una proteina

per generare una nuova funzione, ci sarebbe bisogno di svilupparsi attraverso stadi in cui è priva di utilità, ma ciò potrebbe comportare la delezione nel genoma. Negli eucarioti l'evoluzione delle proteine avviene attraverso la duplicazione genica, seguita dalla mutazione a livello del gene duplicato. Tuttavia i procarioti hanno poche o nessuna proteina senza funzione, che come tali sarebbero molto probabilmente eliminate.

- **Acquisizione di sequenze di DNA da altri organismi:** è probabilmente il modo più comune con il quale i batteri acquisiscono la capacità di produrre nuove proteine. Il trasferimento orizzontale è abituale e si pensa sia un processo evolutivo diffuso. La teoria che organismi specialisti evoluti da batteri multifunzionali con genomi più ampi, attraverso mutazioni di delezione possano aver una qualche validità, ma ciò è probabile perché anche il trasferimento orizzontale gioca un ampio ruolo. Tuttavia, per *M. tuberculosis* gli scambi orizzontali si pensa avvengano raramente, ma nel caso in cui accadano, sono il risultato di una perdita di un importante percorso di variazione genica. Prima della massiccia diffusione di *M. tuberculosis*, si supponeva che il trasferimento orizzontale avvenisse molto più frequentemente e il clone del progenitore sopravvissuto alla selezione si pensava fosse un genoma chimerico, composto da una varietà di ceppi di *M. canettii* (60).

#### ***Piccoli cambiamenti a livello locale sulla sequenza nucleotidica del genoma di M. tuberculosis***

Un concetto sinonimo agli SNPs è stato utilizzato per studi di evoluzione su *M. tuberculosis*, in quanto essi sono meno soggetti ad una pressione selettiva rispetto ad altri marker genetici (63,64). SNPs non sinonimi o codificanti identificati da Sreevatsan *et al* (52) sono stati impiegati per la genotipizzazione di *M. tuberculosis*. L'autore ha infatti osservato 26 geni strutturali di 842 isolati e suggerito un ampio scenario evolutivo per gli organismi del MTBC, caratterizzati da *katG* codone 463 e *gyrA* codone 95, in cui *M. tuberculosis* può essere suddiviso in tre maggiori gruppi genetici (MGGs), con un collo di bottiglia evolutivo approssimativamente di 15000-20000 anni fa, probabilmente attorno al tempo di speciazione di *M. tuberculosis*. Un recente studio basato sull'analisi di 212 SNPs di Filliol *et al* (61) supporta l'esistenza di MGGs e suddivide maggiormente in 6 SNP cluster groups (SCGs) distinti filogeneticamente e 5 sottogruppi, confermando l'idea che la specie *M. tuberculosis* consiste in parecchie famiglie di ceppi molto distinti fra loro.

Il confronto del genoma intero del ceppo CDC1551 di *M. tuberculosis* e H37Rv (rispettivamente MGG2 e MGG3) condotto da Fleischmann *et al* (49) ha rilevato 1075 SNPs, con l'85% di sostituzioni che avvengono in regioni codificanti (95% del genoma). Transizioni (da purina a purina e tra pirimidina e pirimidina) sono molto più comuni (61%) rispetto le trasversioni e il rapporto tra sostituzioni sinonime e non sinonime di *M. tuberculosis* è pari a 1.6, un valore più basso dell'atteso se comparato con *Escherichia coli* e *Salmonella*, indicando che ci sia o una pressione selettiva addizionale sulle sostituzioni sinonime in *M. tuberculosis*, o una ridotta pressione selettiva contro le mutazioni non sinonime. Questo livello restrittivo di variazioni nucleotidiche silenti è considerabilmente minore rispetto a quello osservato in altri batteri patogeni (inclusi altri micobatteri o *Neisseria meningitidis*) che sono strettamente legati all'ospite. La specializzazione

dell'ospite nell'adattamento non può da sola spiegare la variazione genetica limitata che è stata osservata. Mokrousov *et al* (65) sottolinea inoltre l'errore mutazionale da C a T nel gene *rpoB*, il quale conferisce resistenza alla rifampicina. Geni riparatori di errori non sono stati identificati da Cole *et al* in *M. tuberculosis* (66), ma sono presenti parecchie copie del gene *mutT*, il quale codifica per una proteina che rimuove le guanine ossidate, che contrastano la replicazione o gli errori di trascrizione. Forse un sistema di riparazione dell'errore non è richiesto da *M. tuberculosis*, ma l'inattivazione o la down-regolazione di alcuni geni *mutT* potrebbero comportare l'aumento del tasso di mutazione. Le due mutazioni descritte a carico del gene *rpoB* molto di frequente sono transizioni da C a T, le quali avvengono mediante una deaminazione spontanea di citosina a uracile; essendo il *M. tuberculosis* un organismo ricco di G+C esso è altamente a rischio di deaminazione della citosina (65).

### ***Riarrangiamenti Intragenomici***

Elementi trasponibili (come IS6110) o mobili sono comuni nel genoma di tutte le piante, animali e i batteri, dove essi sono stati definite sequenze di inserzioni (IS) (67). Esse sono sequenze di DNA che possiedono l'abilità di integrarsi all'interno del genoma in un nuovo sito attraverso un meccanismo "taglia e cuci", dove un elemento è tagliato via da un sito e inserito in un nuovo punto (hotspot) sul cromosoma, dando luogo, potenzialmente ad un gene interrotto. I trasposoni attivi producono enzimi trasposasi codificati da un gene localizzato tra gli estremi ripetuti invertiti. Il fingerprinting di IS6110 è una tecnica di genotipizzazione usato più ampiamente per *M. tuberculosis* (68). La digestione dell'intero genoma, seguita da ibridazione con una sonda basata su IS6110 rivela differenti patterns sulla base del numero di copie di IS6110 (oltre 25 copie per genoma) e la localizzazione all'interno del genoma. Questi patterns possono differire molto fra loro tra isolati non collegati a livello epidemiologico, ma i pattern di bande di parecchi isolati da un individuo sono relativamente stabili al di là del periodo di malattia (69). Warren *et al.* (70) hanno consultato la letteratura e hanno concluso che i pattern IS6110 sono stati utilizzati inizialmente in risposta alle questioni epidemiologiche, e che la loro relazione in un contesto evolutivo non è stato ancora completamente indirizzato ad una conclusione. In aggiunta, i due raggruppamenti di ceppi di *M. tuberculosis*, come ad esempio campioni con poche (< 5) copie di IS6110 o molte copie (> 5), non chiariscono il pattern evolutivo. Rimane poco chiaro se il ridotto numero di copie degli isolati rappresenti un singolo *lineage* evolutivo, o se essi si sono evoluti indipendentemente e mostrano pattern simili dovuti alla trasposizione di IS6110 all'interno di siti di integrazione preferenziali (71).

### ***Variazioni in numero variabile di ripetizioni in tandem (VNTR)***

Il confronto dell'intero genoma ha anche rilevato la presenza di corte sequenze ripetute, definite come unità micobatteriche ripetute intersperse (MIRUs) (72) e unità di ripetizioni in tandem (ovvero di seguito le une alle altre) in numero variabile (VNTRs) (73), le quali sono sequenze di 40–100 paia di basi (pb) ripetute in tandem. La disposizione e il numero di ripetizioni varia nei diversi ceppi di *M. tuberculosis* e può essere misurata da una moltitudine di metodi basati su PCR. I dati generati sono comparabili tra i laboratori (74). Ferdinand *et al.* (75) hanno descritto l'uso di particolari loci per classificare gli isolati del *M. tuberculosis complex* in differenti famiglie geniche, denominate East African Indian (EAI), Beijing, Haarlem and X, Latin American e Mediterranean (LAM). Il potere discriminativo di questa tecnica dipende dal numero e dal gruppo di loci utilizzati (es. MIRU 2, 10, 16, 23, 26, QUB5) e c'è motivo di credere che questo possa dipendere dalla famiglia genetica alla quale appartengono gli isolati che sono stati esaminati (76). La genesi di alcune di queste ripetizioni in *M. tuberculosis*, le quali hanno sequenze altamente simili, può avere avuto origine da ripetizioni in singole copie iniziali di 53 pb, che poi si sono diffuse su loci differenti attraverso il genoma mediante ricombinazione. Un allineamento di sequenze ripetute, ottenuto da sequenze pubblicate di *M. tuberculosis* CDC1551 (49), suddivise nelle loro unità individuali, mostra che le ripetizioni di ogni locus hanno sequenze molto simili, sebbene ogni ripetizione consenso differisca comunque leggermente da essa per altri loci. È possibile che se solamente una singola copia di sequenze sia in grado di diffondersi attraverso il genoma, un leggero cambiamento nella sequenza può avvenire in questi loci differenti; tali loci inizieranno a duplicare se stessi, così che le differenze di sequenza nella prima ripetizione siano duplicate anche nella seconda ripetizione mediante un processo descritto da Benson *et al.* (77). La sola presenza di una copia di questi 53 pb ripetute nel genoma ad esempio di *M. leprae* e due copie in quello di *M. avium* supporta tale ipotesi.

### ***Direct repeat (DR) analysis: spoligotyping***

Lo spoligotyping è una tecnica di tipizzazione fondata sull'identificazione del polimorfismo di un locus genomico contenente da 10 a 15 copie di sequenze ripetute DR (Direct Repeat) costituite da 36 pb, separate da sequenze spaziatrici non ripetute (Spacer) di 35-41 pb (78). Lo spoligotyping analizza la variabilità del numero e della sequenza delle stesse sequenze spaziatrici. La tecnica è basata sul blotting mediante ibridazione inversa e su PCR, in grado di amplificare e individuare gli spacer e analizzare piccole quantità di templato. Lo spoligotyping è stato dimostrato essere utile nei laboratori clinici, tanto quanto per l'epidemiologia molecolare e la genetica di popolazione. La metodica consente la tipizzazione rapida degli isolati ed è applicabile al monitoraggio in tempo reale della diffusione dei ceppi di *M. tuberculosis* ad elevata virulenza. Essendo basato su PCR, lo spoligotyping è robusto, poco costoso e riproducibile. Il risultato è un prodotto numerico digitale ottenibile anche in un giorno lavorativo (78-80). Lo spoligotyping infatti è applicabile direttamente ai campioni respiratori raccolti senza richiedere la coltura del ceppo micobatterico, abbreviando così i tempi di analisi. I dati di Spoligotyping possono anche essere usati per delucidare l'evoluzione, basata sull'assunzione che le DVRs (Direct Variant Repeat) analizzate nella regione DR possono solamente essere perse (da sole o in gruppo) seguendo il movimento degli elementi IS6110; non possono essere recuperate e non vi sono casi di ricombinazione tra ceppi (81). La convergenza genica è stata dimostrata e, sebbene si pensi sia raro, esiste una possibilità che ciò possa accadere mentre si utilizza lo spoligotyping per studi di evoluzione (79).

## *Analisi di delezione*

Brosch *et al.* (59) hanno reso noto la distribuzione di 20 regioni variabili nel genoma di MTBC e hanno mostrato che la maggior parte di questi polimorfismi non avvengono in modo indipendente, ma risultano da antichi eventi genetici irreversibili in ceppi di progenitori comuni. Sulla base della presenza o assenza di una delezione *M. tuberculosis* specifica (TbD1), i ceppi possono essere divisi in cosiddetti ceppi “ancestrali” e ceppi “moderni” come ad esempio i cluster di *M. tuberculosis* Beijing e Haarlem. La presenza di TbD1 correla anche con la presenza di due copie del MIRU 24 (75)(82,83).

È importante definire chiaramente il significato che si attribuisce ad “ancestrale” e in questo contesto, alcuni ceppi sono simili all’ancestore comune secondo i loci esaminati. La successiva perdita di DNA è stata identificata in un *lineage* evolutivo rappresentato dai ceppi *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis* che divergono dal progenitore di ceppo ad oggi di *M. tuberculosis* prima che avvenisse la delezione di TbD1.

Fino a poco tempo fa si credeva che i bovini originariamente trasmettessero la malattia all’uomo, siccome il raggio di azione di *M. bovis* era più ampio rispetto a quello di *M. tuberculosis*. Le scoperte di Brosch *et al* sostengono il contrario, in quanto i ceppi di *M. canettii* e *M. tuberculosis* ancestrale non mostrano specifiche regioni identificate nello studio, e perciò sembrano essere direttamente discendenti da bacilli tubercolari che esistevano prima che il *lineage* *M. africanum*/*M. bovis* si separasse da quello di *M. tuberculosis* (59).

Se i dati dei marker informativi a livello evolutivo descritti fino ad ora (SNPs, spoligotype, analisi di delezione a alcuni dati di VNTR) si combinano fra loro, un *lineage* evolutivo può essere creato su un’ampia collezione di ceppi diversi (76).

Da dati estratti da uno studio, il quale ha analizzato i markers informativi evolutivi, dividendoli per profili di VNTR in due gruppi per l’analisi (ancestrale e moderna) in base alla presenza di due copie del MIRU 24. L’uso di SNPs come *katG463* e *gyrA95* suddivisero ulteriormente i ceppi in tre gruppi maggiori MGGs 1–3, laddove MGG1 si pensa sia il più antico a livello evolutivo (52). Una volta suddivisi in ceppi ancestrali e moderni, i dati di spoligotyping sono stati poi usati ulteriormente per una mappa di evoluzione genetica in sequenza temporale, basata sulla assunzione che le DVRs nelle regioni DR analizzate possono solamente andare perdute. Seguendo la combinazione e il mappaggio di questi dati, è possibile sovrapporre i principali numeri di ripetizioni dai profili VNTR/MIRU in cronologia per investigare i pattern nella loro evoluzione. Si è pensato che la variazione di VNTR possa avvenire in entrambe le direzioni (incrementando o diminuendo il numero di ripetizioni, attraverso un meccanismo chiamato slipped-strand mispairing (SSM) che consiste nell’errore di appaiamento del filamento a causa dello slittamento di sequenza (84). Il numero di ripetizioni si pensa possa aumentare durante la replicazione se c’è lo slittamento su filamento replicato, e decresce se ciò accade nel filamento guida. Tuttavia, il dato riportato della letteratura suggerisce che la perdita di ripetizioni è più probabile che avvenga nei ceppi moderni rispetto quelli ancestrali (76). Questo tipo di mappatura dimostra gli orologi molecolari relativi di questi marker genetici ampiamente utilizzati di *M. tuberculosis*. Sequenziando la regione DR da un gruppo di isolati strettamente correlati sono state identificate la varianti che hanno spronato Fang *et al.* (85) a calcolare il tasso di evoluzione dei cambiamenti avvenuti in un arco temporale di parecchie centinaia di anni. Un tale tasso di evoluzione così lento è stato osservato

esaminando la trasposizione di IS6110, con solamente 4 eventi di trasposizione avvenuti nel tempo. Tuttavia, ciò differisce dalla maggior parte dei risultati di letteratura che identificano la trasposizione di IS6110 come l'evento più frequente che cambia nella regione DR. Il potere discriminatorio delle analisi di variazioni di VNTR si pensa si avvicini alla tipizzazione di IS6110 con RFLP (IS6110 restriction fragment length polymorphism), un metodo con un orologio molecolare veloce (86), ma solamente quando isolati con poche copie di IS6110 (spesso ancestrali) sono state incluse nell'analisi. Quando invece è esaminata la variazione del pattern di VNTR tra e all'interno delle famiglie genetiche, appare più chiara l'immagine riguardo la variazione sui differenti loci (76). Ad esempio, il MIRU 24 è il locus più variabile nei ceppi moderni, ma appare stabile nei ceppi ancestrali dove possiede un ridotto numero di copie (Figura 8). Analizzando questi dati all'interno di una struttura di famiglie genetiche, ciò indica che la variazione di ripetizioni potrebbe avvenire molto più lentamente di quanto pensato prima. Come descritto da Sreevatsan *et al* (52) esiste la possibilità di un collo di bottiglia avvenuto circa 15.000– 20.000 anni fa, forse attorno al periodo di speciazione di *M. tuberculosis*, mentre i ceppi moderni esistono da forse 4.000 anni o più (87). Questa ipotesi è supportata dalla presenza o assenza di spacer tipici per MGG2 e MGG3 nel codice di spoligotyping di ceppi di mummie egizie. Il DNA micobatterico isolato da uno scheletro di bisonte di 170.000 anni fa portato alla luce da una caverna naturale in cui era intrappolato, ha rivelato la presenza di DVRs o spacer non presenti nei moderni ceppi di *M. bovis*, ciò suggerisce che l'animale fu infettato con un precursore durante in periodo della speciazione (88), in linea con il tempo stimato da Sreevatsan *et al* (52).

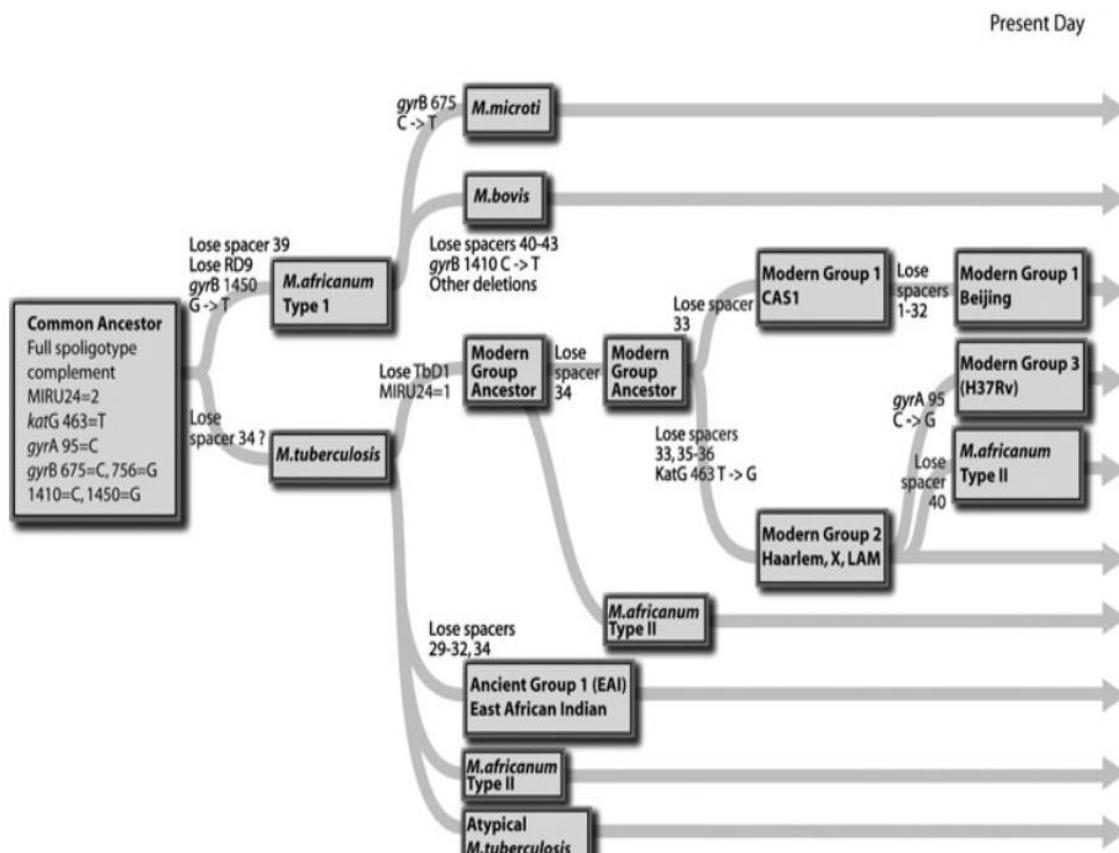


Figura 8 - Schema delle delezioni temporali subite dagli antenatori comuni fino ai moderni *lineages* (76).

### 1.1.8 Tassonomia di *M. tuberculosis*

La tassonomia, non solo dei micobatteri, ha subito, negli ultimi anni, notevoli cambiamenti legati principalmente al passaggio dall'approccio fenotipico a quello genotipico. La classificazione dei micobatteri fondata sul fenotipo si basa sull'analisi di caratteri colturali (velocità di crescita, pigmentazione delle colonie, temperatura di crescita) e di caratteri biochimici (soprattutto attività metaboliche). Tale analisi, inizialmente condotta in maniera empirica, ha assunto negli anni '70 una più rigorosa base scientifica con l'introduzione della tassonomia numerica (89).

La tassonomia basata sul genotipo si è sviluppata in seguito all'individuazione, all'interno del genoma, di regioni conservate. Si definiscono conservate quelle regioni che, regolando funzioni essenziali, hanno subito meno variazioni durante l'evoluzione; esse costituiscono il *target* ideale per gli studi tendenti ad evidenziare affinità o diversità tassonomicamente utili. A differenza di quanto avviene nelle regioni variabili, in cui le diversità sono talmente estese da risultare ininterpretabili a fini classificativi, nelle regioni conservate le mutazioni a livello di singole basi risultano altamente informative.

La conseguenza più appariscente del passaggio dalle analisi fenotipiche a quelle genotipiche è stato l'aumento esplosivo del numero di specie facenti parte del genere *Mycobacterium*. Ad oggi quelle ufficialmente riconosciute sono quasi 130, circa il doppio di quelle conosciute appena 15 anni fa, ma il numero è in continuo aumento. La classificazione in base agli studi sul genoma del micobatterio ha infatti in alcuni casi confermato le specie già definite "classiche" sulla base dei caratteri fenotipici (velocità e temperatura di crescita, pigmentazione delle colonie e i caratteri biochimici e attività metaboliche), mentre in molti casi ha suddiviso le precedenti unità tassonomiche in due o più identità (90).

Fra le regioni conservate, è il gene che codifica per il rRNA 16S quella per cui è disponibile la più vasta mole di informazioni (91). Dall'analisi della sua sequenza genica i micobatteri risultano chiaramente ripartiti in due raggruppamenti maggiori, differenziati per la presenza, in uno di essi, di un'inserzione di lunghezza variabile, all'interno del tratto noto come elica 18. È interessante notare che tutte le specie di micobatteri a crescita rapida mancano di tale inserzione mentre nelle specie a crescita lenta, salvo rare eccezioni, essa è presente.

Sembra certo oggi che i micobatteri ancestrali fossero caratterizzati da una elica 18 corta (senza inserzione) ed, a livello fenotipico, da crescita rapida. Il processo evolutivo avrebbe inizialmente portato alla differenziazione di un nuovo fenotipo a crescita lenta, accompagnato, in quasi tutte le specie, da un'inserzione di 12 pb a livello dell'elica 18. Solo un piccolo gruppo di specie a crescita lenta avrebbe invece conservato la struttura priva di inserzione; tale gruppo, di cui attualmente si conoscono 15 specie, è comunemente indicato come *simiae-like* dato che *M. simiae* è stata la prima specie in cui tale caratteristica è stata riconosciuta. All'interno del raggruppamento che include la stragrande maggioranza dei micobatteri a crescita lenta, contraddistinti dall'inserzione di 12 pb, un successivo filone evolutivo costituito da sole cinque specie (*terrae-like*), è successivamente andato incontro ad un'ulteriore inserzione di 2 pb, sempre all'interno dell'elica 18. Nell'ambito delle specie a crescita rapida, tutte caratterizzate dalla mancanza di

inserzioni nell'elica 18, un gruppo abbastanza consistente di micobatteri, definiti termo-tolleranti, si è differenziato dagli altri per l'inserzione di una singola base (citosina) nell'elica 10.

È nell'ambito dei micobatteri a crescita rapida che la sistematica ha subito i cambiamenti più evidenti negli ultimissimi anni. Fra tali specie il livello di correlazione genetica è elevatissimo, tanto che, risultando il potere discriminante del rDNA 16S spesso inadeguato, i tassonomisti tendono a spostare il loro interesse su regioni meno conservate, e quindi più variabili, quali l'*Internal Transcribed Spacer* ed il gene *rpoB* (92).

### **1.1.9 Analisi filogenetica**

L'analisi del genotipo permette anche di ricostruire il percorso evolutivo che ha portato alla differenziazione delle diverse specie a partire da un progenitore comune (filogenesi) (93). Occorre prendere atto del fatto che l'analisi filogenetica è condizionata in modo consistente dalla regione genomica su cui essa si basa, tanto che lo studio di regioni diverse porta a ricostruzioni evolutive, esprimibili graficamente in forma di dendrogrammi, non sempre sovrapponibili. Tali discrepanze sono soltanto in parte attribuibili all'inadeguatezza degli algoritmi matematici attualmente utilizzati dal momento che uno studio filogenetico ideale dovrebbe estendere il proprio *target* all'intero genoma. Va oggi facendosi strada l'idea che uno studio combinato delle principali regioni conservate potrebbe avere la potenzialità di fornire dati affidabili, essendo a tutt'oggi numerosi i problemi metodologici legati all'analisi dell'intero genoma (92).

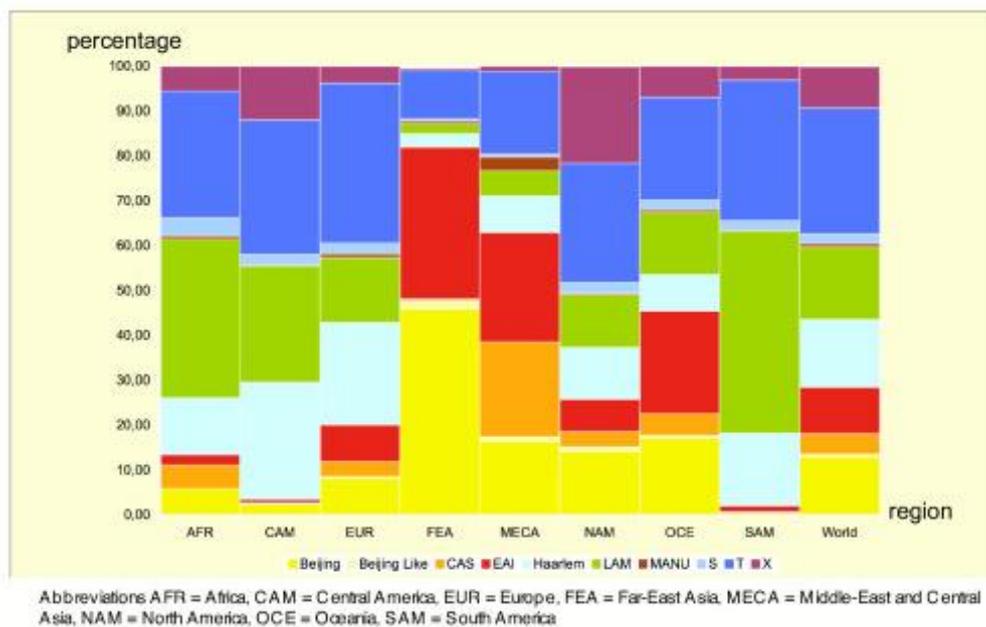
L'uso sempre più diffuso del sequenziamento genico evidenzia con frequenza crescente la presenza, accanto alle sequenze tipiche di specie note, di sequenze "nuove" non presenti in alcun *database* o comunque, quando presenti, non attribuite ad alcuna specie. Di fronte a tali reperti è ragionevole chiedersi se esse individuino nuove specie o, non invece, varianti di specie conosciute. È oltremodo difficile dare una risposta certa a tale domanda, tanto più che i membri del genere *Mycobacterium* sono correlati fra loro in maniera molto più stretta rispetto agli altri microrganismi. Né, d'altra parte, è mai stato stabilito un *cut-off*, cioè un numero minimo di basi discrepanti, che possa essere utilizzato per stabilire che due micobatteri appartengono a specie diverse. L'unico aiuto, attualmente, sembra venire dalla rivalutazione dell'analisi dei caratteri fenotipici, almeno dei più significativi. Rientrano certamente in tale novero, la velocità di crescita e la pigmentazione delle colonie, ma anche i *pattern* lipidici della parete cellulare. Sembra infatti ragionevole supporre che due micobatteri con sequenze affini, ma non identiche, rappresentino varianti della stessa specie se, condividendo velocità di crescita (rapida o lenta) e tipo di pigmentazione delle colonie, hanno anche profili lipidici compatibili; e che appartengano invece a specie diverse se differiscono per almeno uno dei caratteri sopracitati.

Il numero di specie caratterizzate dall'esistenza al loro interno di varianti di sequenza, o *sequevar*, è molto aumentato negli ultimi anni ed attualmente sono pochissime quelle che non ne hanno affatto. Fra quelle col numero di *sequevar* più elevato si segnalano *M. gordonae*, *M. avium* e *M. intracellulare*. La sistematica non prevede entità intermedie fra Genere e Specie; nel genere *Mycobacterium* esistono tuttavia raggruppamenti, a tale livello, che vengono ricordati comunemente. Nota a tutti è la classificazione di Runyon come già citato in precedenza che, almeno per finalità didattiche, ha una certa utilità ancora oggi (94).

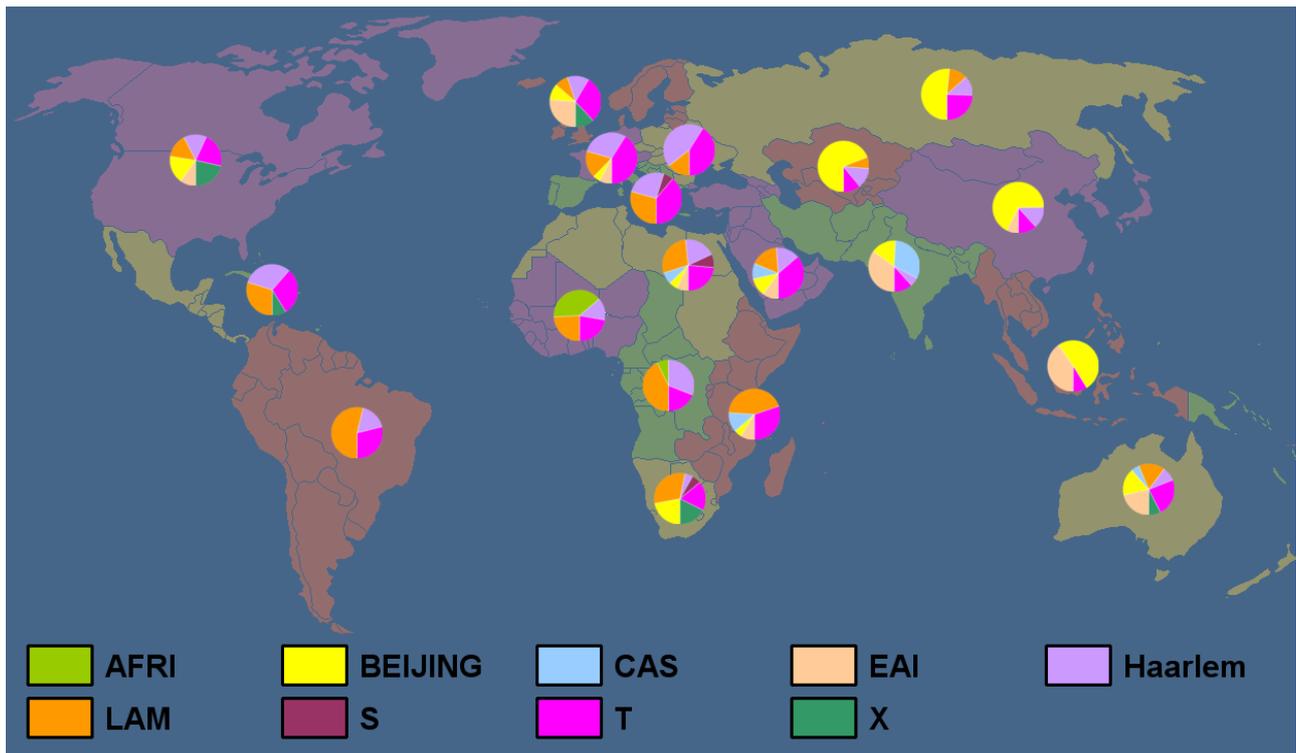
**1.1.10 Macrofamiglie genotipiche del *M. tuberculosis* complex e loro distribuzione geografica secondo il Fourth International Spoligotyping Database (SpolDB4).**

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

Tale studio, infatti, ha fornito una più realistica e attuale immagine istantanea della popolazione genotipica globale e locale del bacillo tubercolare, attraverso l'analisi di 39.295 isolati clinici provenienti da 122 nazioni (Figura 9-10). Per maggior praticità, sono state considerate nella classificazione le seguenti macro-aree geografiche con lo scopo di accorpare le nazioni e definire zone a maggiore significatività statistica: Africa (AFR-1), Centro America (CAM-2), Europa (EUR-3), Estremo Oriente (FEA-4), Medio Oriente e Asia Centrale (MECA-5), Nord America (NAM-6), Oceania (OCE-7), Sud America (SAM-8).



**Figura 9 - Percentuale delle principali famiglie genotipiche di MTC definite mediante Spoligotyping nel Database SPOLDB4 all'interno delle macro-aree prese in esame e nel mondo, Istituto Pasteur, 2011 (95).**



**Figura 10 - Distribuzione di Clades in SITVITWEB, Istituto Pasteur, 2011 (95).**

Sul totale dei ceppi, 35.925 *Spoligo-patterns* appartengono a 1.939 STs (*Shared Type*), i restanti 3.370 (8,6%) sono risultati orfani. All'interno dei STs, 237 appartengono alla sottospecie *M. bovis*, mentre gli altri 1702 STs non sono *M. bovis* (79).

Il 61,8% (n = 22.219) dei ceppi isolati tende a clusterizzare nei 50 STs più frequenti, dimostrando che solo una esigua percentuale di ceppi appartenenti a specifiche famiglie è responsabile di un numero sproporzionalmente elevato di casi. Questo suggerisce che i diversi ceppi di *M. tuberculosis* hanno diverse interazioni con l'ospite, un diverso potenziale di trasmissione (96-98) e infettano popolazioni umane differenti seguendo una distribuzione geografica tipica.

Sono stati identificati 62 *lineages / sublineages* principali, attraverso l'uso di software dedicati che hanno ricercato similarità tra i pattern, effettuando numerosi accorpamenti.

I *lineages* Beijing e Beijing – like (Figura 11) rappresentano il 13% sul totale, circa il 50% dei ceppi isolati in Estremo Oriente, il. Il genotipo Beijing che potrebbe essere stato endemico in Cina per un lungo periodo tempo, sta emergendo anche in altre parti del mondo, specialmente in alcuni stati dell'ex-URSS. Altri lavori hanno messo in luce la presenza di un'associazione tra la famiglia Beijing/W e specifici gruppi di età: in Vietnam la percentuale dei casi di TB sostenuta da Beijing/W è pari al 71% nei pazienti inferiori ai 25 anni, ma al 41% nei pazienti oltre i 55 anni (96).

Si è attribuito al genotipo Beijing/W anche una tendenza a determinare forme extrapulmonari (99) e rara comparsa di febbre, sudorazioni notturne e cavitazioni polmonari. Da quanto finora esposto sembra che il genotipo Beijing/W si trasmetta più facilmente e sia più virulento di altri ceppi di *M. tuberculosis*.

Questo comportamento potrebbe dipendere da fattori estrinseci (ad esempio i flussi migratori delle popolazioni), ma anche da fattori intrinseci alla famiglia.

Tre principali famiglie genotipiche (Harleem, LAM e T) sono più frequenti in Africa, America Centrale, Europa e Sud America (Figura 10 e 12).

In Europa circa il 25% degli isolati appartiene alla famiglia genotipica Haarlem, mentre in Sud America circa il 50% dei ceppi appartiene al *lineage* LAM. All'interno di quest'ultima famiglia, LAM7 è predominante in Asia minore (Turchia), LAM10 in Cameroun, mentre LAM11-ZWE e LAM12-Madrid1 sono di nuovo riscontro.

La “moderna” e assai frequente famiglia genotipica T è stata riscontrata in tutti i continenti e rappresenta il 30% del totale. Essa rimane mal definita con più di 600 STs non classificabili, che sono stati stratificati in 5 sottofamiglie (T1–T5) sulla base di singoli *spacers* differenti. Il nome dei singoli sottogruppi viene costruito affiancando la designazione del clade superiore di appartenenza (T1–T5) alla specifica presunta origine geografica (Es. ST254: T5-Russia/1). ST1737, con un singolo spacer differente da ST254, è stato recentemente trovato in Italia e denominato come “Tuscany”.

Il *clade* Harleem accoglie 4 genotipi differenti e ubiquitari, ben rappresentati in Europa.

Il genotipo EAI (East African Indian), che ha una prevalenza in tutta l'Asia tra il 24,3 e il 33,8%, è rappresentato soprattutto nel Sud – Est Asiatico. All'interno di questo gruppo sono descritti 9 *sub-lineages*, tra questi si ricorda EAI2 (precedentemente denominato da Douglas *et al.* nel 2003 “Manila family”), EAI3-IND e EAI4-VNM, rispettivamente più rappresentati in India e Vietnam.

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

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

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

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

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

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

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

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

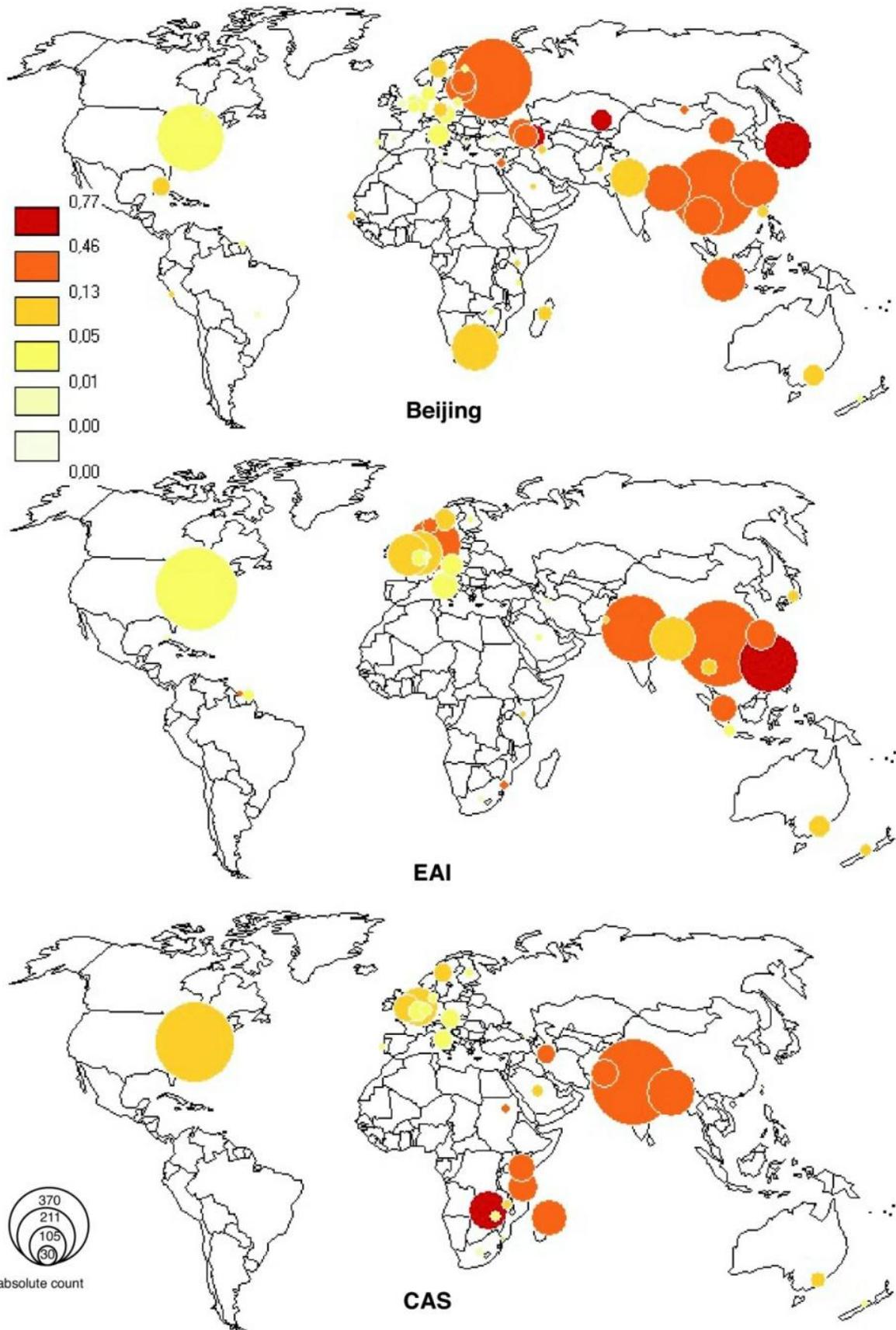


Figura 11 - Planisfero nel quale sono mostrati il numero assoluto (diametro) e la percentuale (colore) delle maggiori famiglie genotipiche in ogni paese, secondo SPOLDB4 (79).

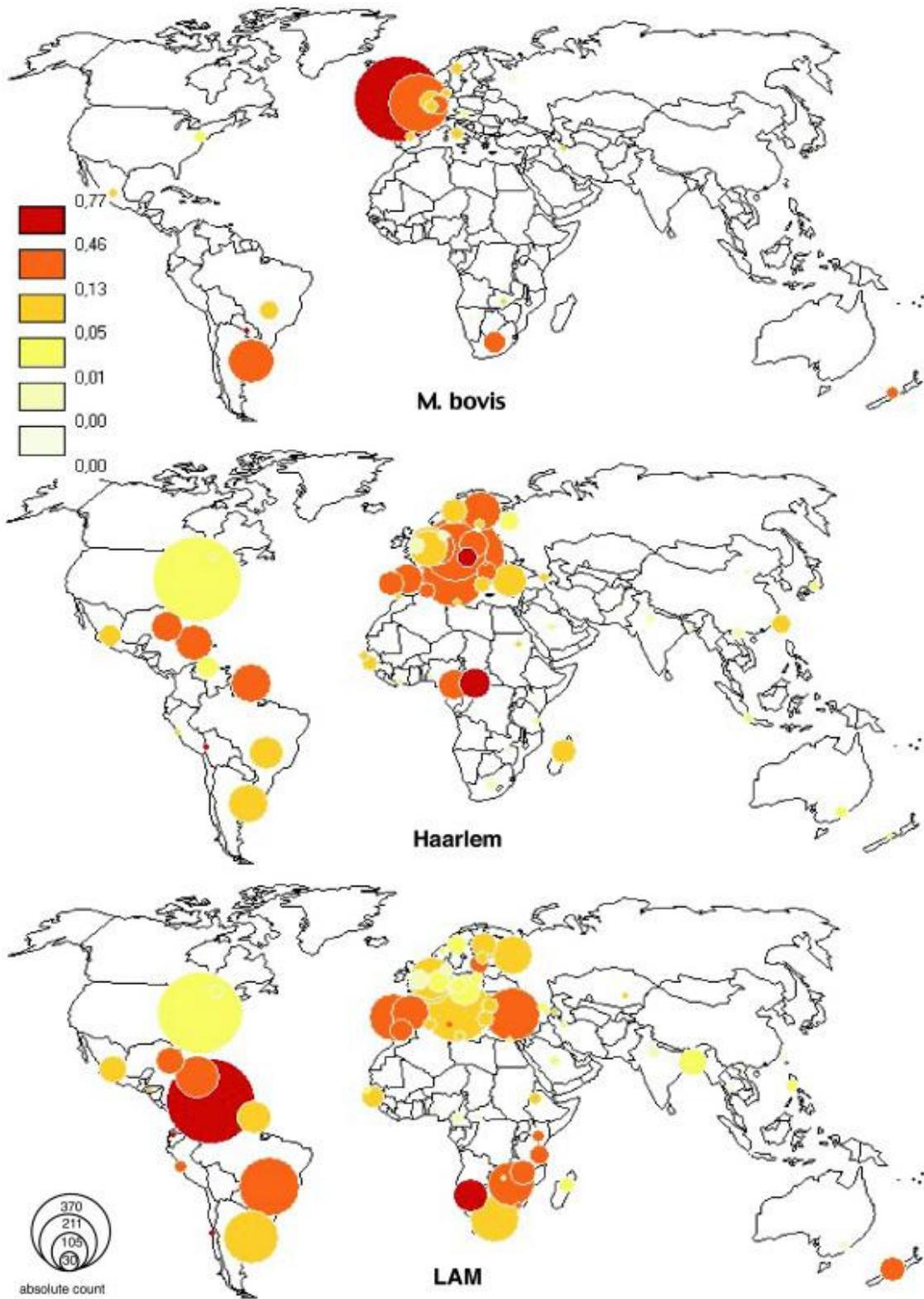


Figura 12 - Planisfero nel quale sono mostrati il numero assoluto (diametro) e la percentuale (colore) delle maggiori famiglie genotipiche in ogni paese, secondo SPOLDB4 (79).

Per lo studio che andremo a condurre è stato scelto un tipo di raggruppamento di *lineages* differente. Il *lineage* **Indo-Oceanic** comprende principalmente le famiglie EAI (East African Indian), EAI-MANILLA e MANU (tipicamente di origine Indiana), quello definito come **East-Asian** invece il Beijing. Il gruppo maggioritario, che comprende molti sub-lineages è quello **Euro-American**, in quanto vede al suo interno la famiglia Haarlem, LAM (Latin American e Mediterranean), X, T (comprensiva della variante Tuscany isolata in Italia), H37Rv (un ceppo molto virulento usato spesso come controllo positivo nella genotipizzazione molecolare) e S (riconducibili alle isole maggiori Sicilia e Sardegna). I gruppi minoritari appartengono ai *lineages* **CAS/Delhi** (che considera principalmente le famiglie CAS-Delhi, CAS-Kili), il *lineage* **West Africans** che raggruppa le famiglie AFRI-1 e AFRI-2 e la famiglia genotipica **BOVIS**.

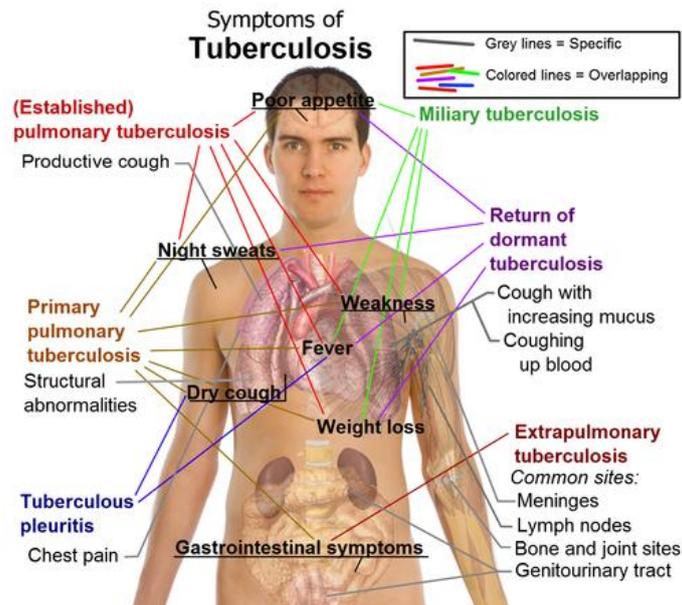
## ***1.2 Patogenesi***

### **1.2.1 Diffusione e progressione della TB**

La TB causata da *M. tuberculosis*, un batterio Gram positivo, si diffonde da persona a persona mediante aerosol. Tali malattie che si diffondono mediante droplets sono particolarmente insidiose poiché queste minuscole particelle generate da colpi di tosse non solo sono in grado di evadere le difese delle vie aeree superiori, ma rimangono nell'aria più a lungo rispetto alle particelle di maggiore dimensione. Considerato che la pulizia quotidiana delle superfici di ambienti di lavoro ospedalieri avviene con disinfettanti economici, ma poco efficaci per eliminare tutti i batteri che si sono depositati su di esse, per la sterilizzazione completa dell'aria si richiedono speciali filtri più costosi. I raggi ultravioletti (UV) sono ora utilizzati in molti ambienti di laboratorio per ridurre il numero di batteri trasportati dall'aria.

Il laboratorio di micobatteriologia costituisce un ambiente di lavoro dove, per la pericolosità dei materiali processati, delle attrezzature usate e la complessità delle attività che vi si svolgono, deve essere posta una particolare attenzione nella tutela della salute e della sicurezza degli operatori sanitari. L'alta infettività del *M. tuberculosis* è correlata alla bassa dose infettante nell'uomo (dose infettante al 50% <10 bacilli). Le direttive riguardanti la sicurezza ed i principi base per le misure di prevenzione e di protezione del rischio di incidenti ed infortuni nell'ambiente di lavoro classificano il *M. tuberculosis* nel gruppo 3 ed di conseguenza deve essere manipolato in zone di contenimento di 2° e 3° livello. L'incidenza dell'infezione tubercolare, fra il personale di laboratorio è stimata essere da tre a nove volte maggiore di quella di un individuo che svolge un altro lavoro (100).

I sintomi della TB sono febbre, tosse (spesso con escreato con tracce di sangue), perdita di peso e mancanza di forza muscolare. In una situazione di TB attiva si verifica la progressiva e irreversibile distruzione del tessuto polmonare; nel peggiore dei casi i batteri sono in grado di evadere dal polmone e dare il via ad una malattia di tipo sistemico definita come TB extrapolmonare o disseminata (Figura 13). *M. tuberculosis* può infatti infettare qualsiasi area del corpo, incluse ossa, fegato, milza, tratto gastrointestinale, articolazioni e cervello (TB miliare). La forma sistemica della malattia nella maggior parte dei casi è mortale. La TB è di norma una patologia che non si sviluppa rapidamente. Spesso lo stato di salute del paziente continua a peggiorare negli anni prima della morte finale. In individui con AIDS, la TB uccide però molto più rapidamente, in alcuni casi entro pochi mesi, ed il tasso di mortalità si avvicina all'80% (101).



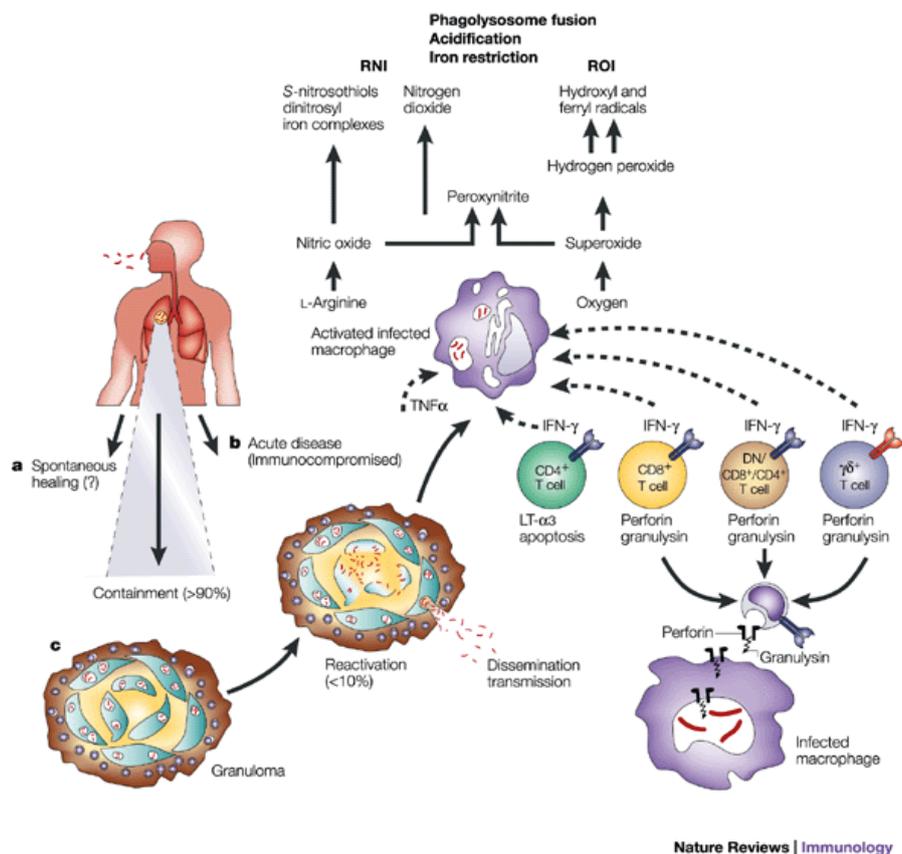
**Figura 13 – Sintomi della TB (102).**

La TB è una malattia severa ma non del tutto altamente contagiosa. La trasmissione avviene solamente quando si verifica un contatto ravvicinato e prolungato tra un malato e un individuo suscettibile. Tuttavia, anche al di sotto delle opportune condizioni di trasmissione, un individuo con una TB attiva può infettare molte altre persone. Una persona considerata infetta da *M. tuberculosis* è colei o colui che subisce una cuticonversione da negativo a positivo durante in test su cute per TB. La conversione alla positività indica che il micobatterio è stato inalato ed è in grado di sopravvivere nel tessuto polmonare abbastanza a lungo da trarre l'attenzione nel sistema immunitario. Solamente tra il 3% e 5% delle persone positive al test cutaneo attualmente sviluppano TB attiva. La principale difesa dei polmoni sono i macrofagi alveolari. *M. tuberculosis* ha sviluppato un'abilità nel sopravvivere e crescere in macrofagi alveolari non attivati; quelli attivi invece sono in grado di uccidere il batterio.

### **1.2.2 Ruolo dei linfociti T helper CD4+ e T citotossici CD8+**

La capacità dell'individuo nel sviluppare una risposta immunitaria rapida ed efficace ne determina se l'esito finale alla esposizione tubercolare condurrà alla malattia sintomatica o al contenimento dell'infezione. L'interazione iniziale tra *M. tuberculosis* e i macrofagi genera una risposta cellulo-mediata sia da parte dei linfociti T helper (CD4+) sia dai linfociti T citotossici (CD8+). Le cellule T CD4+ rispondono prevalentemente ad antigeni internalizzati in vescicole endosomiali da cellule presentanti l'antigene (APC) professionali, in quanto tali antigeni vengono degradati all'interno delle vescicole stesse e presentati in associazione a molecole MHC di classe II ai linfociti CD4+. Per contro le risposte dei linfociti CD8+ sono evocate principalmente da microbi presenti nel citosol delle cellule infettate, dal momento che le proteine citoplasmatiche vengono degradate in quel compartimento e presentate ai linfociti T CD8+ in associazione con molecole di classe I.

Il principale contributo delle cellule T CD4+ deriva invece dalla sottocategoria dei CD4+ (Th1) che rilasciano interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), il quale provoca la trasformazione del monocita in macrofago e la sua conseguente attivazione, da sommarsi anche ai segnali trasmessi dall'interazione della molecola CD40 con il suo ligando (CD40L) (Figura 14). In risposta ai segnali indotti da CD40 e da IFN  $\gamma$  nei macrofagi si osserva l'aumento della sintesi di numerose proteine, responsabili dello svolgersi delle funzioni effettrici di tali cellule: conseguentemente, i macrofagi attivati uccidono i microbi extracellulari e quelli fagocitati principalmente grazie alla produzione di intermedi reattivi dell'ossigeno, ossido nitrico ed enzimi lisosomiali. IFN- $\gamma$  stimola anche le cellule endoteliali per legarsi alle cellule T, innescando così il loro movimento fuori dal circolo sanguigno verso l'interno del tessuto adiacente così che possano convergere verso la sede di infezione. I macrofagi stessi svolgono la funzione di APC in maniera più efficiente, grazie all'aumentata espressione di molecole coinvolte nella processazione e presentazione dell'antigene. Il significato di questo fenomeno è quello di attivare in toto i linfociti T, generando così un circuito di amplificazione delle risposte cellulo-mediate.



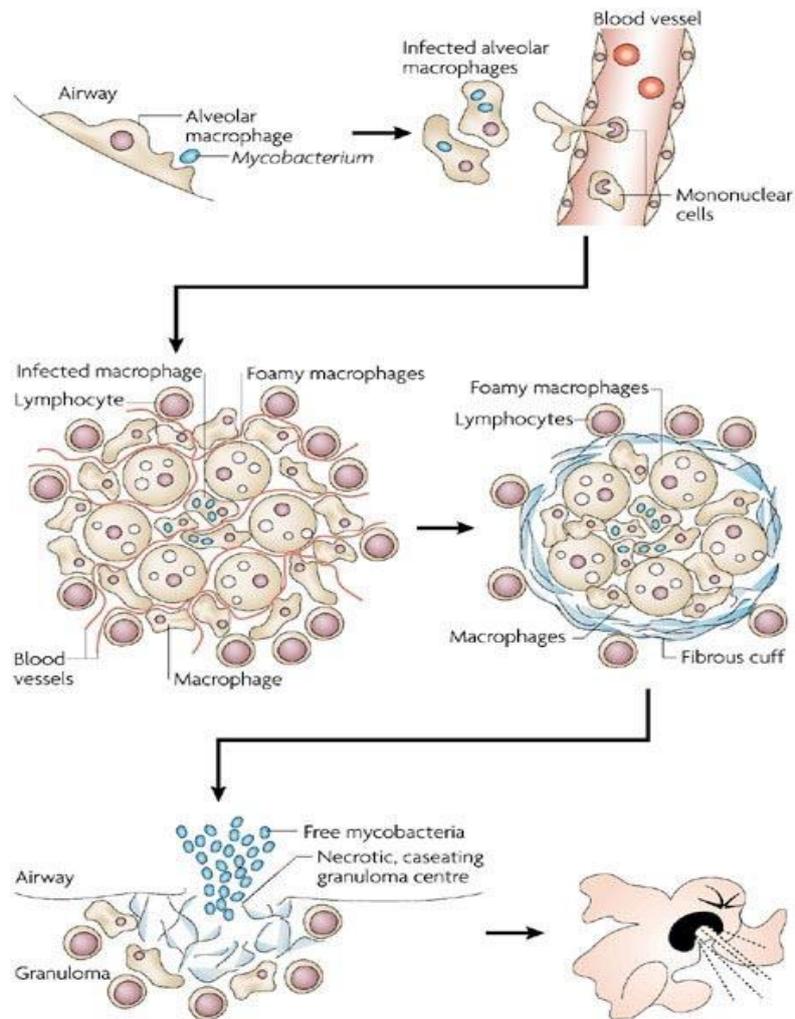
**Figura 14 – Schema di diffusione del micobatterio e risposta immunitaria dell'ospite (103).**

In individui adulti sani esposti ad un numero relativamente basso di batteri, i macrofagi attivati di solito appaiono abbastanza velocemente per fermare l'infezione prima che si inneschi una necrosi tissutale a livello del polmone. Inducono, inoltre, un processo infiammatorio acuto mediante la secrezione di citochine, in particolare TNF, IL-1 e chemochine, nonché grazie alla produzione di mediatori lipidici a breve emivita,

quali il fattore attivante le piastrine, le prostaglandine ed i leucotrieni. L'effetto complessivo di questi mediatori è di indurre una flogosi locale la cui componente principale è costituita da granulociti neutrofili, che fagocitano e distruggono l'agente infettivo. I macrofagi ed i neutrofili attivati rimuovono i componenti del tessuto danneggiati nel corso del processo flogistico, facilitando così la riparazione del tessuto dopo che la *noxa* è stata eliminata. L'attivazione macrofagica viene però parzialmente inibita da una sottoclasse delle linfociti CD4+ Th2, la quale stimola la produzione di anticorpi, la cui funzione appare poco efficace poiché i batteri Gram positivi sono di natura siero resistenti e quindi *M. tuberculosis* può crescere indisturbato all'interno dei fagociti inaccessibili agli anticorpi circolanti prodotti. In questo modo vengono limitati gli effetti potenzialmente dannosi delle risposte cellulo-mediate (104).

Alcuni individui risultano positivi al test cutaneo per TB ma non sviluppano una TB sintomatica. In bambini e adulti che non generano una risposta cellulo-mediata rapida ed efficace, guidata dai linfociti T, i macrofagi attivati non si presentano se non molto più tardi durante il processo patologico, cosicché i batteri sono in grado di crescere e replicarsi all'interno dei macrofagi. Dato che l'infezione non si è risolta mediante l'azione di cellule fagocitiche, nuove cellule T, leucociti polimorfonucleati e macrofagi continuano ad essere attratti nella sede di infezione accumulandosi attorno al sito di crescita dei micobatteri. I macrofagi a stretto contatto con i batteri si fondono in un unico complesso assumendo un aspetto che ricorda quello delle cellule epiteliali (da cui il termine cellule epitelioidi) o possono fondersi tra loro formando cellule giganti multinucleate chiamate cellule di Langhans. I linfociti T con altri macrofagi circostanti formano attorno ad esse un punto di distruzione tissutale contenendo l'infezione dei micobatteri. Aggregati di macrofagi attivati, spesso assiepati intorno a molecole antigeniche, producono noduli di tessuto infiammatorio denominati granulomi.

In alcuni casi, sebbene i fagociti non siano in grado di uccidere i batteri, le cellule T e i macrofagi sono efficaci nell'indurre e circoscrivere la lesione crescente del tessuto con uno spesso strato di fibrina. La circoscrizione della lesione è detta tubercolo, il quale può calcificare, dando luogo a severe lesioni visibili in radiografia ai raggi X. La risposta cellulo-mediata (cellule T e macrofagi) che produce lesioni tubercolari è definita come risposta granulomatosa poiché il tubercolo appare al microscopio come in granuloma (Figura 15).



**Figura 15 – Azione macrofagica e formazione del granuloma (105).**

Le risposte cellulo-mediate si fondano anche sull'intervento dei linfociti T citotossici (CTL), qualora gli antigeni batterici vengano trasportati dai fagosomi nel citosol o qualora i batteri riescano ad evadere dai fagosomi, entrando nel citoplasma delle cellule infettate. In queste condizioni, infatti, non sono più sensibili all'azione dei fagociti e l'infezione può essere debellata solo per intervento dei CTL. Cellule T CD8+ uccidono e distruggono i fagociti infettati cosicché i batteri possono essere ingeriti e sterminati dai macrofagi infettati. Se tuttavia i macrofagi attivati non riescono ad eliminare completamente l'agente patogeno essi continuano a produrre citochine e fattori di crescita che lentamente modificano l'architettura del tessuto sede della reazione flogistica: si parla di reazione d'ipersensibilità ritardata (*delayed type hypersensitivity*, DTH). Il termine ipersensibilità si riferisce al danno tissutale provocato dalla risposta immunitaria.

I fagociti che non uccidono efficacemente i batteri causano quindi danno tissutale al polmone, sia per il rilascio di enzimi lisosomiali e per la produzione di Tumor Necrosis Factor (TNF) di tipo  $\alpha$ . TNF- $\alpha$  che distrugge il tessuto polmonare è probabilmente responsabile della perdita di peso, sintomo di individui affetti da TB. Una importante caratteristica delle lesioni durante una infezione di TB è la loro liquidità. Inizialmente nelle aree dove i batteri sono in fase di crescita hanno un aspetto spesso e consistenza caseosa (necrosi caseosa).

Man mano che i micobatteri crescono i fagociti si infiltrano nell'area di necrosi così da renderla ancora più liquida. Poiché un liquido è molto più facile che si trasformi e dissolva in aerosol che in materiale caseoso compatto, un individuo con necrosi colliquativa è molto più contagioso di una persona le cui lesioni sono in fase di necrosi caseosa. Quest'ultima fase per altro previene il movimento dei micobatteri fuori dall'area di infezione, mentre in fase colliquativa essi possono migrare e diffondersi rapidamente in altre parti del corpo dando luogo a TB di tipo disseminate.

Il fattore quindi di virulenza associato a micobattere che contribuisce alla sua sopravvivenza nei macrofagi è la sua abilità nel prevenire la maturazione del fagosoma impedendo il trasporto della pompa ATPasi vacuolare (VATPasi) sulla membrana del fagosoma stesso. L'ingestione dei batteri da parte dei fagociti di norma è seguita da acidificazione dei fagosomi stessi, mediati dall' VATPasi, la quale pompa protoni al suo interno, così da ridurre il pH. La pompa inoltre in condizioni normali ipomodula l'espressione di citochine pro infiammatorie come ad esempio TNF $\alpha$ , i cui valori possono predisporre l'organismo ad una TB di tipo polmonare. L'acidificazione non solo è in grado di inibire la crescita batterica all'interno dei fagosomi, ma media anche la fusione tra fagosoma e lisosoma, con la conseguente attivazione e rilascio di fattori con capacità battericida. In questo modo *M. tuberculosis* interrompe sia l'acidificazione del fagosoma e sia la sua unione con il lisosoma e si garantisce una sopravvivenza nell'ospite.

Soggetti che quindi hanno sviluppato in tempo una risposta per bloccare la crescita batterica e prevenire lo sviluppo di una malattia sintomatica severa, non sono però definitivamente fuori pericolo. Alcune zone di lesione polmonare contengono ancora dei micobatteri vitali. Una caratteristica inusuale dei micobatteri è l'abilità di sopravvivere per decenni in tali lesioni. Successivamente nell'arco della vita, la soppressione del sistema immunitario (come accade per i pazienti sieropositivi, affetti da tumori e tossicodipendenti) potrebbe permettere la fuoriuscita di tali batteri dalle zone di lesione e la ripresa della loro crescita. Tali forme di TB sono dette ricorrenze tubercolari, simili alle TB primarie a livello infettivo logico e sintomatologico.

## ***1.3 Diagnosi***

### **1.3.1 Diagnosi di TB di tipo microbiologico**

La identificazione rapida di coloro i quali hanno in corso una TB sintomatica non solo permette che la terapia sia somministrata prima che vi siano forti danni al polmone ma è di aiuto a prevenire la diffusione dei batteri nei confronti di altre persone suscettibili. I mezzi utilizzati per una rapida diagnosi di TB, soprattutto di quelli MDR, rimane ancora ad oggi l'esame microscopico del materiale biologico del paziente, quali escreato, broncolavaggio o broncoaspirato, seguito dall'esame colturale degli stessi.

L'esame microscopico diretto per la ricerca di bacilli acido-alcol resistenti (BAAR) mediante colorazione di *Ziehl-Neelsen* o immunofluorescenza con auramina-rodamina applicabile a strisci di vari campioni biologici (espettorato, broncoaspirato, liquor, urine, feci) è il metodo più rapido per la identificazione dei micobatteri. Fornisce un risultato entro 24 ore, di tipo quantitativo utile per stimare la contagiosità del paziente (106). Nei pazienti con sospetto di TB polmonare, ma non in grado di produrre espettorati, oppure in quelli con esito negativo all'esame diretto, un espettorato indotto mediante aerosol di soluzione salina ipertonica permette di potenziare il rendimento dell'esame batteriologico. In alternativa deve essere effettuata una broncoscopia con raccolta di lavaggio bronco alveolare (BAL) e bronco aspirato (BA), oppure si può prelevare un aspirato di succo gastrico, soprattutto nei bambini piccoli e negli adulti allettato incapaci di fornire una espettorazione spontanea o indotta. L'esame microscopico diretto presenta, tuttavia, limiti evidenti quali una bassa sensibilità in quanto per fornire un risultato positivo richiede la presenza di almeno 5000- 10000 bacilli per ml. Inoltre non consente di condurre una diagnosi di specie (107). E' stato stimato che circa il 40-60% dei pazienti con TB polmonare ed il 75% dei pazienti con TB extrapolmonare non viene identificato con tale esame. E' sempre necessario, pertanto, completare gli accertamenti con i metodi colturali considerati il *gold standard* diagnostico. Sono 500 volte più sensibili dell'esame batterioscopico e mettono a disposizione un elevato numero di bacilli per ulteriori indagini, come i test di farmocoresistenza e la genotipizzazione. *M. tuberculosis* cresce solo su terreni solidi arricchiti con sostanze complesse, quali Lowenstein-Jensen, Petragani, richiedendo da tre a sei settimane per produrre colonie visibili. In ragione del lungo tempo richiesto e dei risultati frequentemente negativi nei campioni paucibaccillari, sono state sviluppate negli ultimi anni nuove tecniche colturali in *medium* liquidi, tra le quali più recente è il sistema MGIT 960 (108,109). Si tratta di un metodo automatizzato, non radiometrico, che si basa sulla misurazione del consumo di ossigeno, mediante un sensore a fluorescenza ultravioletta, rilevabile in presenza di crescita micobatterica in *vials* di terreno liquido modificato *Middlebroch 7H9*. La crescita può essere rilevata già entro una settimana. Un altro sistema automatizzato, che tuttavia richiede materiale radioattivo, è il BACTEC 460 (108,109). Consiste in una procedura che prevede la coltivazione dei micobatteri in un terreno liquido contenente acido palmitico marcato con isotopi radioattivi. Dopo solo una o due settimane di crescita la presenza di micobatteri viene valutata misurando la CO<sub>2</sub>, quindi si esegue il NAP test (beta nitro alfa acetilamina beta idrossi propriofenone) che inibisce selettivamente la crescita di *M. tuberculosis* e di *M. bovis* (110). Per ovviare alla ridotta sensibilità dell'esame diretto e ai lunghi tempi richiesti dalle colture, sono state sviluppate e

perfezionate metodiche di biologia molecolare che consentono la rapida amplificazione diretta nei campioni biologici degli acidi nucleici micobatterici attraverso l'impiego di *primer* oligonucleotidici specie-specifici o genere-specifici. Attualmente le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici più estesamente impiegate sono quelle a variazione ciclica della temperatura: *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Ligase Chain Reaction* (LCR). La PCR permette di evidenziare rapidamente (entro 24 ore) e direttamente in campioni biologici il DNA di *M. tuberculosis*, anche se presente in un numero cento volte inferiore a quello minimo necessario per avere una positività all'esame microscopico diretto ( $10^1$  versus  $>10^5$ ) (110). La sensibilità della metodica varia in relazione alla positività o negatività del campione alla colorazione Ziehl-Neelsen, rispettivamente  $>95\%$  e  $40-70\%$  (110) mentre la specificità è costantemente alta  $95-100\%$ . La sua efficacia dipende da diversi parametri di amplificazione quali la concentrazione del DNA, le dimensioni del frammento che deve essere amplificato ed il numero di ripetizioni di tale frammento. La LCR è una variante della PCR. Una ligasi termostabile è usata per unire due sonde che sono complementari alla sequenza bersaglio di DNA. Ha alta sensibilità e specificità per i campioni sia positivi sia negativi all'esame microscopico. L'uso di questa tecnica è limitato dal costo elevato. Le tecniche molecolari presentano degli indubbi vantaggi: elevata sensibilità e specificità, rapidità di esecuzione, possibilità di porre diagnosi di specie. Ad essi si controbilanciano svantaggi quali l'accuratezza diagnostica variabile in base ai preparati commerciali utilizzati e i costi elevati. Un'ulteriore applicazione delle tecniche molecolari consiste nella determinazione del profilo genotipico di resistenza farmacologica. Le metodiche impiegate a tal fine sono note come *line probe assays* (LIPAs) *nucleic acid amplification tests* (NAATs), di cui ne esistono due varianti commerciali principali. Il DNA amplificato di *M. tuberculosis* viene applicato su *strip* contenenti *probes* specifici per i geni *target* di resistenza a rifampicina (*rpo*) ed isoniazide (*katG*). La sensibilità e la specificità di tali test varia rispettivamente tra il  $80-100\%$  e  $99-100\%$  (111,112). Possono essere utilizzati tanto per campioni clinici quanto per isolati colturali. E' possibile in tal modo ottenere un antibiogramma molecolare in tempi rapidi senza necessità di attendere la crescita in coltura e l'esecuzione delle prove di sensibilità standard ai farmaci anti-micobatterici di prima linea che richiedono tempi superiori anche alle 6 settimane.

### **1.3.2 Diagnosi radiologiche e immunologiche**

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

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

L'acquisizione dello stato di ipersensibilità verso *M. tuberculosis* viene verificata con le prove tubercoliniche che documentano semplicemente l'avvenuto contatto dell'organismo con il bacillo di Koch e non quello di malattia tubercolare attiva. Queste consistono nell'impiego di sostanze (tubercoline) costituite dal corpo batterico e sono di notevole importanza in campo epidemiologico per rilevare l'entità dell'endemia tubercolare in una popolazione. La preparazione comunemente usata è il *Purified Protein Derived* (PPD), una frazione proteica complessa altamente purificata. La tecnica più impiegata in clinica è l'intradermoreazione di Mantoux, che consiste nell'iniezione intradermica di 0,1 mL della diluizione di tuberculina prescelta (Figura 16).



**Figura 16 - Immagini di test tubercolinico cutaneo (113).**

Viene evocata una risposta immunitaria cellulo-mediata in cui i linfociti T Helper CD4+ nel sito di iniezione secernono citochine, le quali richiamano nell'area cellule polimorfo nucleate, monociti e macrofagi. La fuoriuscita di liquido dal torrente circolatorio dei vasi sanguigni, causata dalla migrazione dei fagociti, insieme all'effetto infiammatorio locale delle citochine, genera rossore e rigonfiamento dell'area (eritema). L'accumulo e deposito di fibrina guidato da macrofagi e monociti favorisce un indurimento della sede di iniezione. A seguito della somministrazione intradermica di un antigene tubercolare si assiste quindi ad una reazione di ipersensibilità ritardata (reazione di tipo IV) in un individuo precedentemente esposto, ma non necessariamente con TB attiva in corso, per il quale si osserva persistente rossore e indurimento dell'area. Per le indagini di *routine* si inoculano 5 U di PPD e si esegue la lettura dopo 48-72 ore. La reazione viene considerata perciò positiva se compare un infiltrato locale di almeno 10 mm di diametro (5 mm nei pazienti immunocompromessi) (114). Nel 70-80% dei soggetti precedentemente infettati da *M. tuberculosis* l'inoculazione risulta positiva, mentre nei pazienti con TB in corso di infezione da HIV la reazione intradermica al PPD è positiva nel 40-70% dei casi, percentuale che scende all'11-60% nei pazienti con AIDS (110). Questa indagine, tuttavia, è gravata da una scarsa specificità come dimostrato da reazione di falsa positività in soggetti vaccinati con il bacillo di Calmettè-Guerin (BCG) ed in casi di esposizione a

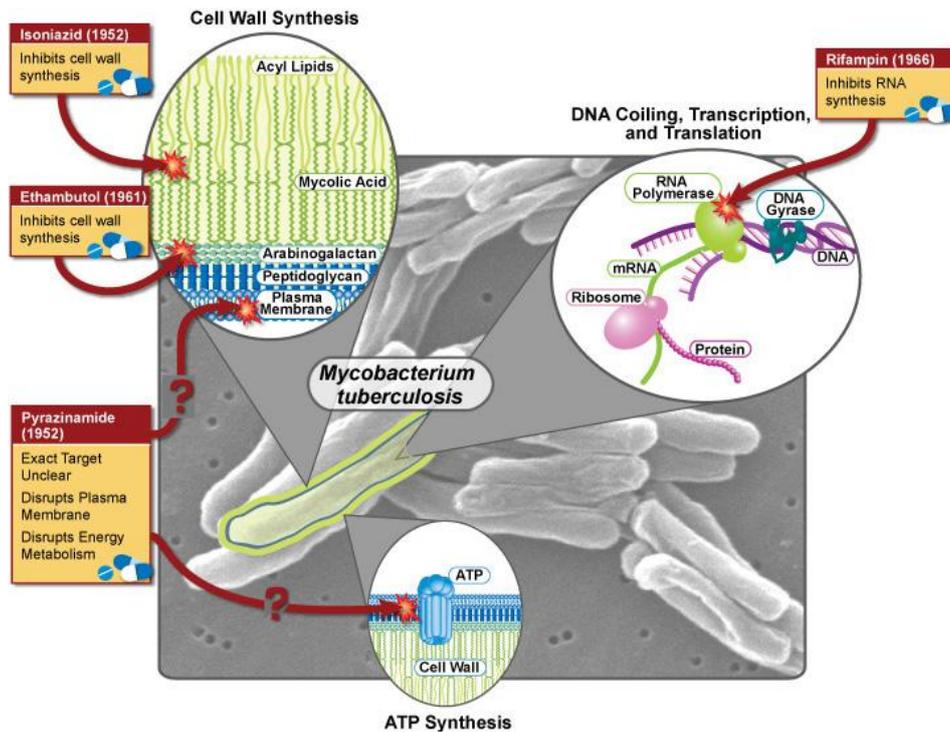
micobatteri ambientali. Inoltre si caratterizza anche per una bassa sensibilità in soggetti immunodepressi. Al fine di migliorare la diagnosi dello stato di infezione tubercolare latente, recentemente sono stati allestiti dei saggi immunologici basati sulla misura della risposta immune dell'ospite verso antigeni specifici di *M. tuberculosis*, ESAT-6 e CFP-10, assenti nella maggior parte dei micobatteri atipici e nel ceppo BCG. Tali test, noti come *T cell-based IFN- $\gamma$  Release Assay (TIGRA)*, misurano sostanzialmente la quantità di IFN- $\gamma$  rilasciato da cellule sensibilizzate agli antigeni specifici tubercolari (115). I due saggi attualmente applicati in ambito clinico sono il *QuantiFERON* e l'*ELISpot*. Il *QuantiFERON* è basato sulla tecnica *ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)*: misura la concentrazione di IFN- $\gamma$  nel supernatante di un campione di sangue diluito dopo 24 ore di incubazione con ESAT-6 e CFP-10. L'*ELISpot (Enzyme Linked Immunospot Assay)* valuta i linfociti T specifici responsivi agli antigeni considerati. Dopo isolamento delle cellule mononucleate periferiche da un campione ematico, le cellule T vengono esposte a ESAT-6 e CFP-10. Se precedentemente sensibilizzati *in vivo*, i linfociti T rilasciano IFN- $\gamma$ , generando uno spot nero. I TIGRA sono dotati di una elevata sensibilità (81-90%) e specificità (96%), superiore rispetto a quella del test tubercolinico cutaneo. Secondo le recenti raccomandazioni del *Center for Disease Control (CDC)*, negli adulti i TIGRA presentano, in pratica, le stesse indicazioni dei test alla tubercolina. Nei soggetti HIV positivi, è possibile non poter interpretare i test se la conta di linfociti CD4+ è fortemente diminuita (116).

## ***1.4 Terapia***

### **1.4.1 Emergenza e trattamento di TB farmaco resistenti**

Molti degli antibiotici usati in terapia ad eccezione della rifampicina, streptomina e alcuni fluorochinoloni sono inefficaci nel trattamento della TB. La terapia antitubercolare ha come caratteristica principale quella di essere una terapia di associazione tra più farmaci e protratta per un lungo periodo data la lenta moltiplicazione dei micobatteri. La colonna portante nella cura alla TB è costituita da una miscela di antibiotici speciali definiti di prima linea contro i micobatteri per la migliore efficacia e la ridotta tossicità: tali farmaci sono isoniazide, etambutolo, rifampicina e pirazinamide. Isoniazide, rifampicina dotati della più elevata attività battericida e l'etambutolo batteriostatico invece interferisce con il metabolismo dei carboidrati, la pirazinamide, ad attività battericida sui bacilli tubercolari intracellulari, la streptomina attiva contro i bacilli in rapida replicazione nel distretto extracellulare (Figura 17).

I farmaci di seconda linea, caratterizzati invece da una minore efficacia e da una maggiore tossicità, utilizzati solo nei pazienti resistenti o intolleranti ai farmaci di prima linea. Sono farmaci di seconda linea rifabutina, capreomicina, amikacina, kanamicina, acido paraminosalicilico (PAS), cicloserina, etionamide, tiacetazone, i fluorochinoloni ed alcuni  $\beta$  lattamici. Presentano meccanismi di azione diversi ed una diversa capacità di azione nei tre compartimenti: extracellulare metabolicamente attivo, intracellulare relativamente inattivo ed un terzo localizzato all'interno della sostanza caseosa. Etionamide agiscono in modo tale da inibire la sintesi di acidi micolici, componenti principali della parete micobatterica come descritto già in precedenza.



**Figura 17 – Trattamento della TB di Prima Linea per TB sensibili ai farmaci (117).**

Le linee guida internazionali suggeriscono diversi regimi di trattamento, la cui scelta deve essere effettuata in base alla tipologia del caso, alla forma clinica e alla sensibilità farmacologica. L’OMS raccomanda un regime iniziale di sei mesi con rifampicina, isoniazide, pirazinamide ed etambutolo per 2 mesi, seguito da rifampicina e isoniazide per 4 mesi. In associazione con altri 3 antitubercolari principali, la pirazinamide permette di abbreviare la durata del trattamento.

Le popolazioni di micobatteri contengono tuttavia dei germi naturalmente resistenti agli antitubercolari. La selezione di questi mutanti per via dell’effetto di un trattamento non indicato come la scelta incorretta di associazione farmacologica, può portare all’apparizione di una nuova popolazione resistente a diversi antibiotici. Il rischio di generare ceppi resistenti giustifica i principi fondamentali del trattamento standardizzato della TB legati alla combinazione di farmaci per determinati periodi di tempo. Se alla fine del secondo mese di terapia l’esame diretto sull’escreato è sempre positivo deve far sospettare una ridotta *compliance* da parte del paziente, problemi di malassorbimento o la presenza di farmacoresistenza ed il trattamento è da ritenersi fallito con conseguente necessità di modificare il regime terapeutico in corso. Spesso l’intero trattamento antitubercolare non viene effettuato solo in clinica ma l’ultima fase della terapia può essere assunta anche a livello domiciliare ed è in questo frangente temporale che si verificano i maggiori problemi di scarsa aderenza alle prescrizioni mediche.

Partendo dal presupposto che l’identificazione e l’isolamento del micobatterio comporta a livello di esami microbiologici almeno 2 settimane e oltre, la scelta del corretto regime terapeutico, per un paziente con sospetto di TB, può essere applicata anche senza avere la certezza degli esiti dei test e riadattato durante la degenza e con i risultati di antibiogramma analizzati. La somministrazione preventiva di tali composti comporta quindi un dispendio abbastanza consistente di denaro; soprattutto per i pazienti con micobatteri

MDR la terapia deve essere somministrata fino a quando non venga arrestata la crescita dei batteri che nel frattempo sono in grado di diffondere la malattia.

Nello specifico tale fenomeno ha ricevuto la massima attenzione internazionale all'inizio degli anni '90, con lo sviluppo di epidemie di ceppi MDR-TB verificatesi in soggetti HIV positivi negli Stati Uniti e in Europa (118). Per convenzione si definiscono MDR-TB quelle forme di TB sostenute da micobatteri che mostrano un alto livello di resistenza all'isoniazide ed alla rifampicina, con o senza resistenza ad altri farmaci antitubercolari. Con il termine *Extensively Drug Resistant Tuberculosis* (XDR-TB), invece, si intende una malattia provocata da ceppi di *M. tuberculosis* resistenti a isoniazide, rifampicina, un fluorochinolone ed ad almeno una molecola iniettabile tra quelle di seconda linea (amikacina, capreomicina e kanamicina) (119).

Il termine XDR è stato coniato per la prima volta nel 2006 a seguito di una epidemia di TB estesamente resistente in una zona rurale del Sud Africa, Tugela Ferry (120). Alla base della resistenza agli antitubercolari sussiste la selezione di mutanti batterici con un'innata resistenza ai chemioterapici. La resistenza alla rifampicina è provocata da una mutazione puntiforme nel gene *rpoβ* che codifica per la subunità β dell'RNA polimerasi. La resistenza all'isoniazide è dovuta a mutazioni a livello di due siti principali, il gene *katG* ed il gene *inhA* (Figura 18). Queste mutazioni non sono direttamente collegate e così mutazioni separate sono necessarie perché un microrganismo suscettibile diventi MDR (121). Diversi fattori favoriscono la selezione di mutanti batterici farmaco-resistenti. Tra questi un ruolo di rilievo spetta a pregressi trattamenti antitubercolari inadeguati, incompleti o da fattori genetici dell'ospite: è stata osservata un'associazione tra gli aplotipi HLA-DRB1\*1 / HLA-DRB1\*14 e la suscettibilità a MDR-TB. Epidemie di TB farmaco-resistente possono, quindi, nascere dalla conversione di ceppi *wild-type* suscettibili in ceppi farmaco-resistenti durante il trattamento, ma anche dalla trasmissione di forme di *M. tuberculosis* resistenti tra individui (122). La farmaco-resistenza acquisita nel corso della terapia è la via principale da cui originano i ceppi tubercolari farmaco-resistenti. D'altra parte, il fattore più importante che ha portato alla crescita esponenziale dei casi di TB MDR e XDR sembra essere la trasmissione della resistenza (Figura 19). Il ruolo svolto dalla resistenza trasmessa può essere chiarito dalla valutazione della clonalità dei ceppi micobatterici nel corso di epidemie di TB: ad esempio l'85% dei ceppi di TB XDR isolati nell'epidemia nella regione di Tugela Ferry in Sud Africa appartengono alla stessa famiglia genotipica, la famiglia KwaZulu-Natal (120). Dal punto di vista clinico, le manifestazioni di MDR-TB e XDR-TB non differiscono da quelle sostenute da ceppi sensibili, ma la prognosi è peggiore. Tutti gli studi finora condotti evidenziano un'aumentata probabilità di fallimento terapeutico ed un'accresciuta mortalità nei casi di XDR-TB (120). Il trattamento delle forme MDR/XDR prevede l'impiego di farmaci di seconda linea. Sono stati proposti diversi schemi la cui scelta suggeriscono le linee guida internazionali, deve essere fatta se possibile sulla base dei risultati dell'antibiogramma. Qualsiasi farmaco di prima linea a cui *M. tuberculosis* sia sensibile deve essere utilizzato, così come ogni appropriato antitubercolare di seconda linea, in modo da stabilire un regime con almeno 4-5 molecole efficaci. Se possibile, dovrebbe essere incluso nel regime almeno un farmaco iniettabile. Il trattamento deve prolungarsi per almeno 18 mesi.

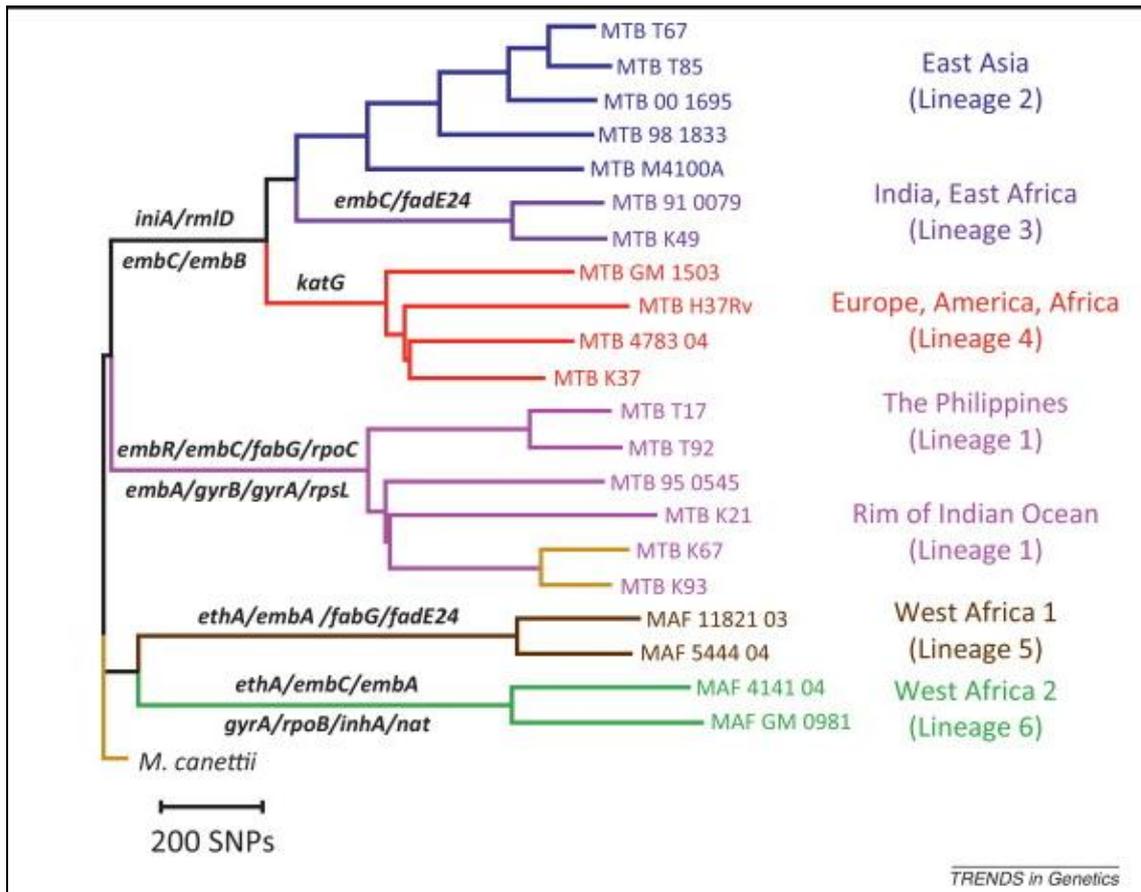
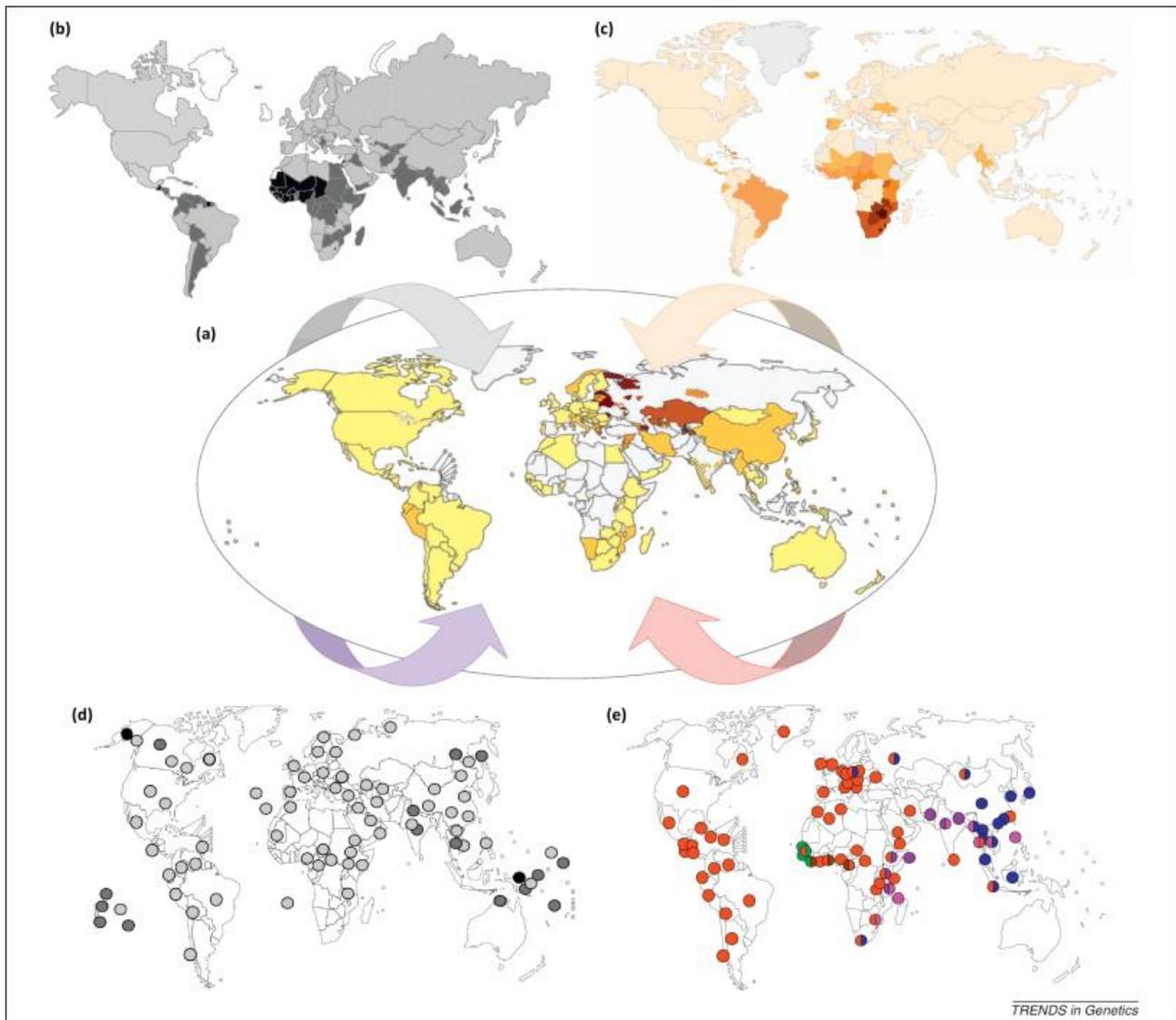


Figura 18 - I geni associati alla resistenza ai farmaci contengono mutazioni *M. tuberculosis lineage* specifici. L'albero filogenetico relativo ai 6 *lineages* principali di *M. tuberculosis* associati alla TB umana, basata su 21 sequenze dell'intero genoma. I geni indicati sono quelli ad essere associati alla farmaco-resistenza e che definiscono un particolare *lineage*, mediante sostituzioni nonsinonime. Questo comporta potenziali interazioni epistatiche tra la base genetica di un dato ceppo e una specifica mutazione che conferisce farmaco-resistenza. SNPs, single nucleotide polymorphisms (123).



**Figura 19 - L'eterogeneità delle MDR-TB. (a) la proporzione di nuovi casi di TB MDR (immagine centrale - L'aumento della tonalità di colore indica l'incremento di proporzioni di casi) è distribuita in modo eterogeneo è influenzata da una moltitudine di fattori, che includono: (b) l'effettiva variabilità dei programmi di controllo (qui rappresentata da tassi di incidenza globale dei casi stimati; le aree più scure indicano la stima dei tassi di casi più bassi); (c) la presenza variabile di comorbidità (qui, rappresentata dalla prevalenza di HIV tra i casi di TB incidente; le zone più scure indicano la prevalenza più elevata); (d) differenti fattori legati all'ospite (qui rappresentati dalla presenza dell'antigene II allele DQB1\*0503 dei leucociti umani (HLA), che fu il primo allele HLA associato con l'incremento del rischio di TB; le nazioni più scure indicano le zone di maggior abbondanza); e (e) la distribuzione globale dei *lineages* filogenetici di *M. tuberculosis* (i sei *lineages* principali di ceppi di *M. tuberculosis* associati alla TB umana, conosciuti in ordine temporale e in base alla distribuzione geografica, sono rappresentati da cerchi di colore differente, in corrispondenza ai clades indicati nella corrispondente immagine soprastante (123).**

### 1.4.2. Vaccino

L'unico vaccino al momento disponibile per la prevenzione della TB è il BCG, vaccino vivo attenuato derivato da un ceppo virulento di *M. bovis*. Sviluppato da Calmette e Guérin, è stato utilizzato nell'uomo a partire dal 1921 e tuttora è impiegato nell'ambito dei programmi d'immunizzazione della WHO. Il ceppo di *M. bovis* entra all'interno dei macrofagi e replica velocemente prima di essere ucciso. Esso è in grado di stimolare le stesse difese immunitarie che si attivano contro *M. tuberculosis*, dando quindi per scontato che tutti gli antigeni importanti vengano espressi durante tale risposta immunitaria. La sua somministrazione è raccomandata per tutti i bambini inferiori all'anno di età in quanto può essere somministrato oralmente in tutta sicurezza. Negli anni sono state somministrate milioni di dosi in tutto il mondo a costi molto contenuti, senza mai causare effetti collaterali o tossici. Molti studi hanno evidenziato che la protezione conferita da BCG ha un'ampia variabilità, oscillando dall'80% al 10-30%. Inoltre, sebbene prevenga lo sviluppo di una malattia disseminata nell'infanzia e di forme meningee di TB, non garantisce un'adeguata protezione nei confronti della TB polmonare in età adulta. Diverse ipotesi sono state avanzate per spiegare la variabilità dell'efficacia della vaccinazione con BCG ed i suoi bassi livelli di protezione. Una prima spiegazione di questo fenomeno può risiedere nelle mutazioni subite dal ceppo originario di BCG: l'analisi del genoma ha mostrato che alcuni vaccini BCG hanno perso geni importanti durante il processo di attenuazione in laboratorio. Proteine presenti nel ceppo originario sono assenti (ESAT-6 e CFP-10) o non espresse in diversi ceppi di BCG. In aggiunta, è stato sottolineato che l'esposizione pre-vaccinale a micobatteri ambientali potrebbe indurre una risposta immunitaria in grado di mascherare le risposte a BCG o anche di inibire l'immunità indotta da BCG (124). La necessità di un nuovo vaccino più efficace è dunque evidente. L'applicazione di moderne tecnologie ha consentito lo sviluppo di oltre 200 nuovi vaccini ad oggi in fase di studio (125).

Tra di essi i principali sono:

- vaccini micobatterici vivi. Ceppi vivi di *M. microti* e *M. vaccae* sono stati utilizzati come vaccini negli animali, ma la loro efficacia è molto variabile. Mutanti micobatterici, mancanti di alcuni lipidi strutturali, si sono rivelati più protettivi di BCG quando somministrati ai topi;
- BCG ricombinanti. Una grande mole di lavoro è stata compiuta per incrementare l'efficacia di BCG introducendo delle copie aggiuntive dei geni esistenti o reintroducendo alcuni dei geni persi durante il lungo processo di attenuazione *in vitro*. Una forma ricombinante di BCG (rBCG30), che sovraesprime una proteina secretoria di 30 kDa, ha mostrato una buona protezione nei modelli animali;
- vaccini vaccinia-trasportati: vettori vivi, come forme ricombinanti di Salmonella modificate per veicolare geni immunodominanti di *M. tuberculosis*, sono alcuni dei candidati vaccini che hanno mostrato buona protezione nei modelli animali;
- vaccini a DNA. Sono stati a lungo testati in modelli animali vaccini contenenti plasmidi che codificano per antigeni micobatterici (come i membri della famiglia delle micolil transferasi ed

alcune *heat shock proteins*); subunità proteiche e proteine di fusione. Alcune proteine micobatteriche (ESAT-6, Ag 85 B e HSP60) ed una proteina ibrida nata dalla fusione di ESAT-6 e Ag85B sono tra i più comuni vaccini candidati (126).

### **1.4.3 Il problema delle ricorrenze**

Si definisce ricorrenza di TB (*recurrence* in inglese) un nuovo episodio di TB che si manifesta successivamente al completamento di un ciclo di trattamento antitubercolare per una precedente TB. Le ricorrenze di TB possono essere dovute sia ad una recidiva (*relapse*), sia ad una reinfezione esogena (*exogenous reinfection*). Le prime vengono comunemente associate a un fallimento della terapia, mentre le reinfezioni esogene sono dovute all'esposizione a un nuovo ceppo di *M.tuberculosis* differente rispetto al precedente. Queste ultime vengono considerate molto meno frequenti; tuttavia, le recenti osservazioni che in aree ad alta endemia tubercolare il tasso di episodi di ricorrenze supera addirittura quello dei nuovi casi di TB ha risvegliato l'interesse sull'argomento (127-129). Infatti, la corretta attribuzione della genesi dell'episodio di ricorrenza ha ovvie implicazioni sulla scelta del nuovo ciclo terapeutico per il paziente, ma ha importanti ricadute pratiche anche per quanto riguarda le politiche di contenimento dell'infezione, la valutazione dell'efficacia dei trattamenti standard, le scelte dell'antibiotico profilassi dei contatti, nonché per le strategie nello sviluppo di un vaccino efficace.

### ***Stima del fenomeno***

Dei 6,2 milioni di casi di TB ufficialmente notificati nel mondo nel 2011, 0,3 milioni di casi sono stati classificati come ricorrenze (130). Nei paesi ad alta incidenza la percentuale di ricorrenze oscilla in media tra il 5 e il 15% mentre per quelli a bassa incidenza non supera in media il 2% (131). Nell'ultimo decennio (1999-2008) il sistema di notifica italiano della TB ha documentato anche i casi di recidiva, che hanno rappresentato in media circa l'11 % del totale dei casi segnalati; con un picco percentuale del 13,4 % nel 2001, mentre negli anni successivi la proporzione si è assestata nel tempo fino a raggiungere un valore percentuale pari al 9,2% nel 2008. Gli studi che hanno analizzato la rilevanza del fenomeno in base alla sua origine (reinfezione o recidiva) stimano che le ricorrenze dovute alle reinfezioni siano nettamente meno numerose rispetto alle recidive, anche in pazienti che hanno effettuato un trattamento soddisfacente (127) (132,133). Tuttavia un'indicazione precisa sui tassi di incidenza separati di recidive e reinfezioni esogene è stato oggetto di pochi studi, che hanno offerto risultati non sempre concordanti. Tra questi, uno studio di coorte del 2001 nella popolazione dei minatori del Sud Africa ha rilevato tassi di recidiva del 3,3/100 persone/anno nella popolazione HIV-positiva e del 4,1/100 persone/anno nella restante popolazione, mentre i tassi delle reinfezioni esogene erano rispettivamente il 5,3/100 persone/anno (HIV-positivi) e lo 0,2/100 persone/anno (HIV-negativi) (134). Uno studio più recente effettuato a Shanghai in Cina, un altro dei paesi più colpiti dalla TB, ha rilevato un tasso di recidive pari al 10,4/100 persone/anno e di reinfezioni esogene pari al 16,6/100 persone/anno (135).

## ***Meccanismi e cause delle ricorrenze***

### **Recidive**

Una recidiva di TB si verifica quando i bacilli tubercolari persistono dopo trattamento specifico.

Le cause di tale fallimento terapeutico possono essere diverse: terapie subottimali per errori terapeutici, carenza di risorse o somministrazione di farmaci sottodosati, inefficacia di terapie standard per la presenza di farmacoresistenza, cicli terapeutici troppo brevi e, molto spesso, scarsa adesione del paziente a terapie articolate e di lunga durata (136). Proprio perché legate ad un'inadeguatezza del trattamento, la gran parte delle recidive si verifica entro i primi 2 anni dalla fine del trattamento (137).

### **Reinfezioni esogene**

Il completamento di un ciclo di terapia antitubercolare dopo un primo episodio di TB non garantisce una protezione da un secondo episodio dovuto ad un ceppo differente, contratto in seguito ad una successiva esposizione al bacillo tubercolare (136) (138,139). Tuttavia, può anche essere contemplata l'eventualità di un'infezione simultanea con due differenti ceppi di *M.tuberculosis*, a diversa sensibilità al trattamento antibiotico o con diverso grado di virulenza, in cui la presunta reinfezione esogena è il risultato di una selezione cronologica differenziata di ceppi non identificati al momento della prima diagnosi (139).

Recenti studi di immunologia clinica hanno evidenziato un vantaggio selettivo per le varianti clonali in grado di contenere la produzione di TNF- $\alpha$  nel secondo episodio di TB, mentre non sono state osservate differenze sostanziali nella velocità di crescita dei ceppi e dei livelli di citochine prodotti da cellule infettate durante entrambi gli episodi (140).

### ***Applicazioni delle tipizzazioni molecolari***

Per quanto recidive e reinfezioni tubercolari dipendano da cause differenti, le manifestazioni cliniche della malattia risultano assolutamente indistinguibili e anche le informazioni anamnestiche (comorbidità, storia di trattamento, *compliance*, nuova esposizione al microrganismo) spesso non sono in grado di fornire elementi utili a differenziare le due tipologie di ricorrenza.

La soluzione del problema è stata garantita dalle analisi di epidemiologia molecolare, in grado di distinguere in modo specifico e sensibile quali ricorrenze siano classificabili come recidive e quali come reinfezioni esogene, a seconda che il ceppo del primo e secondo episodio siano i medesimi o differiscano fra loro. Ad oggi le metodiche molecolari per la tipizzazione dei ceppi di *M.tuberculosis* più accurate vanno considerate la *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) (141) e il *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Variable Number Tandem Repeat* (MIRU-VNTR) (72).

## ***2 . Scopo del progetto***

La mancata riduzione dei casi di TB in Italia e la persistenza di una quota di casi di TB MDR ha risvegliato l'attenzione sulle strategie per limitare la diffusione della malattia e ha sollecitato un maggior impegno a investire risorse per lo sviluppo di farmaci efficaci anche per i casi di pazienti con multifarmacoresistenze.

In questo studio ad ampio raggio, basato sull'analisi di casi di TB MDR, gli obiettivi che ci siamo proposti sono i seguenti:

1. analisi temporale della diffusione della TB MDR nell'area milanese a partire dagli anni '90
2. confronto tra le caratteristiche cliniche dei pazienti MDR e pazienti non-MDR
3. descrizione dei principali *cluster* di pazienti MDR e analisi di fattori di rischio
4. ricerca di una associazione dei pazienti MDR con *lineages* di *M. tuberculosis*
5. analisi delle ricorrenze di TB e loro associazione con il profili di resistenza farmacologica

### ***3 . Materiali e metodi***

#### **3.1 Popolazione d'interesse**

I 5299 pazienti tubercolotici arruolati per il nostro studio appartengono al bacino di raccolta del Centro di Riferimento Villa Marelli per la TB in Lombardia e del Dipartimento di Malattie Infettive dell'Ospedale "L. Sacco" di Milano in collaborazione con i rispettivi reparti di Microbiologia. Il periodo di tempo considerato per questo studio ha inizio nell'anno 1993 e termina nell'anno 2010.

L'insieme dei pazienti scelti per lo studio comprendeva tutti i pazienti dell'area Milanese con un episodio di TB diagnosticato sulla base di dati microbiologici o clinici congruenti con i criteri diagnostici della letteratura scientifica internazionali (142)

La diagnosi microbiologica definitiva di TB si ottiene con l'isolamento in coltura di *M. tuberculosis complex* con la combinazione di un terreno solido e di un terreno liquido MGIT. I terreni all'uovo come il Löwenstein-Jensen vanno comunque impiegati poiché consentono la crescita di alcuni ceppi di *M. tuberculosis complex* e di alcune specie non tubercolari che non riescono a svilupparsi negli altri terreni.

Le seguenti concentrazioni di farmaci sono state applicate per condurre il test di suscettibilità alle molecole anti-TB: isoniazide (1 mg/μl), etambutolo (5 mg/μl), rifampicina (1 mg/μl), and streptomina (10 mg/μl).

Per le successive analisi sono stati caratterizzati raggruppamenti di casi (*cluster*) di popolazione sulla base della tipizzazione molecolare RFLP (ove presente l'isolato di micobatterio) e osservate le relative appartenenze dei singoli individui a *lineage* o *sublineage* di *M. tuberculosis* confrontandoli anche con i dati di genotipizzazione generati dalle metodiche di Spoligotyping e MIRU-VNTR (ove ancora disponibile l'isolato microbiologico).

Per quanto riguarda invece gli episodi di ricorrenza di TB i criteri di inclusione dei pazienti sono stati i seguenti:

- due o più episodi di TB diagnosticata nel periodo 1995-2010 (per pazienti con multipli episodi di ricorrenza per lo studio è stato considerato solamente il primo episodio di ricorrenza)
- completamento del trattamento antitubercolare durante il primo episodio di TB
- Diagnosi di ricorrenza di TB basata su risultati clinici, radiologici e microbiologici
- la disponibilità di almeno un isolato di *M. tuberculosis* per ogni episodio di TB per la successiva genotipizzazione molecolare

### 3.2 Estrazione e lisi al calore

Dei soggetti in questione era presente in ceppoteca un campione biologico, come escreato, broncolavaggio, broncoaspirato o di altra provenienza, che a suo tempo è stato messo in coltura in fiale di vetro contenenti terreno solidificato Lowenstein-Jensen (LJ) disposto a becco di clarino (Figura 20). Successivamente, dopo 3-4 settimane di crescita, le colonie sferiche di micobatterio che compaiono sul terreno vengono asportate mediante ansa sterile in una criovials contenente un volume finale di 1000 µl terreno liquido arricchito *Middle Brook 7H9*. Tale terreno è composto da: Middlebrook in polvere (2,35 g), acqua (400 ml), glicerolo (50 ml), tween 80 (0,25 ml); al terreno sterilizzato in autoclave per 10 minuti (temperatura di 120°C e una pressione di 2 bar), è stato aggiunto, in condizioni di asettiche (sotto cappa a flusso laminare), un arricchente (50 ml), in modo da ottenere un volume finale di 500 ml di terreno totali da aliquotare in vials.



**Figura 20 - Colture su LJ di *M. tuberculosis* (143).**

I campioni conservati in criovials alla temperatura di -80°C sono stati selezionati e trasportati in incubatore alla temperatura di 37°C e CO<sub>2</sub> < 0.5%. Un'aliquota di coltura liquida di ogni campione è stata stoccata in una provetta eppendorf da 1,5 ml. Queste ultime sono state inattivate al calore (95°C) per 45 minuti in un termostato a secco e quindi centrifugate a 13.000 rpm per 10 minuti a RT (temperatura ambiente), in modo che la parete del micobatterio venga denaturata e precipiti sul fondo della provetta (*pellet* cellulare) ed il DNA possa trovarsi in soluzione (sovrantante). Il surnatante, pari a 160 µl circa per ogni coltura, contenente il DNA batterico estratto, viene recuperato in una nuova provetta eppendorf, opportunamente siglata e conservata a -20°C pronte per essere genotipizzate in laboratorio. La rimanente parte di colonie sono state riposte e crioconservate nuovamente -80°C.

### **3.3 Genotipizzazione Molecolare**

Tutte le metodiche di genotipizzazione molecolare utilizzate per lo studio prevedono una previa l'estrazione di DNA micobatterico da colture solide o liquide di campioni biologici di pazienti con TB mediante lisi al calore come appena descritto.

#### **3.3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism DNA Fingerprinting**

L'RFLP è una metodica basata sull'utilizzo della sequenza di inserzione *IS6110* come *marker* molecolare. Rappresenta attualmente la tecnica più diffusamente applicata nei diversi laboratori per la genotipizzazione di *M. tuberculosis* (141). Le sequenze di inserzione sono elementi genetici mobili o trasponibili (TGE), ovvero sequenze di DNA capaci di trasferirsi da un sito del genoma ad uno o più siti differenti. Attualmente la sequenza maggiormente utilizzata è il frammento di inserzione *IS6110*, presente esclusivamente nel genoma di *M. tuberculosis* complex (144,145). La capacità di discriminare tra i diversi genotipi tubercolari attraverso l'utilizzo di *IS6110* è legata alla differenza di numero e di posizione di tale sequenza all'interno del genoma micobatterico, conseguente alla duplicazione e/o al movimento del frammento per delezione o per riarrangiamento del DNA cromosomico (146,147). L'emivita di trasposizione di *IS6110*, ovvero il periodo durante il quale il profilo di ibridizzazione IS-specifico non muta, è di circa 3-4 anni. Ne consegue che i profili RFLP sembrano essere sufficientemente stabili e polimorfici per lo studio delle dinamiche di trasmissione della TB nel tempo e nello spazio (144,145). Dopo estrazione del DNA genomico degli isolati e digestione tramite enzima di restrizione *PvuII*, i frammenti di DNA ottenuti, una volta separati tramite elettroforesi, sono sottoposti a *Southern blot* ed a successiva ibridizzazione con sonda specifica *IS6110* precedentemente marcata (Figura 21). I pattern di ibridazione sono visualizzati tramite chemiluminescenza ed autoradiografia (147). Questa metodica ha un elevato potere discriminativo e i risultati sono stabili e riproducibili, ma presenta alcune criticità. In primo luogo, richiede notevoli quantità di DNA ottenibile solo dopo prolungata coltura, cosa che comporta un notevole ritardo nei risultati; secondariamente è abbastanza costosa e necessita di sofisticati sistemi *software* per l'analisi e la comparazione dei risultati. Infine, ha un basso potere discriminativo per isolati con un numero di copie di *IS6110* inferiore a 6, richiedendo quindi l'utilizzo di una metodica di tipizzazione secondaria per la differenziazione di tali isolati.

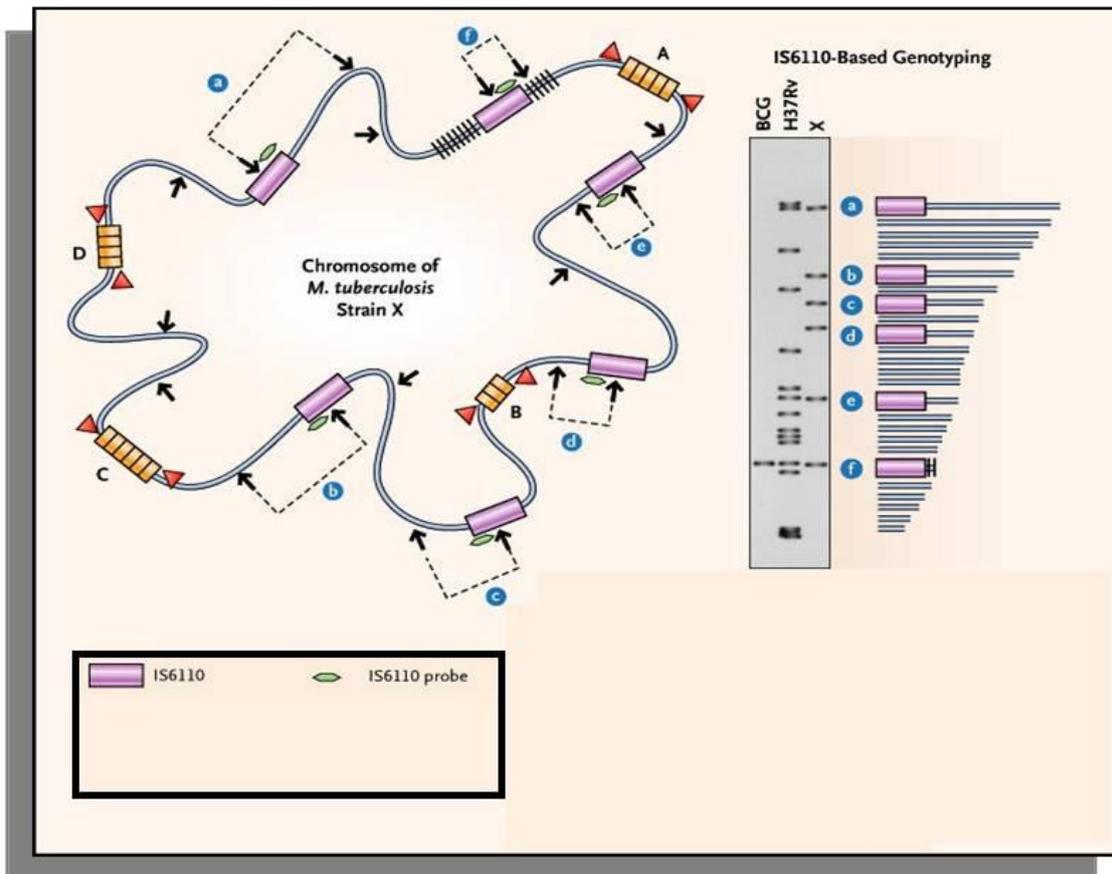


Figura 21 – Sequenza di inserzione IS6110 nel genoma di *M. tuberculosis* e siti di clivaggio dell'enzima di restrizione *PvuII* nella metodica di genotipizzazione RFLP-DNA fingerprinting (148).

### 3.3.2 Mycobacterial Interspersed Repetitive Units of Variable Number of Tandem Repeats

La più recente e innovativa metodica di genotipizzazione è il *MIRU-VNTR*. Consiste in una tecnica basata sull'amplificazione mediante *multiplex* PCR di elementi di DNA di 40-100 pb ripetuti in *tandem* in numero variabile distribuiti in regioni intergeniche nel genoma di *M. tuberculosis* complex, dette *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRUs)*. Nel 2000 è stato evidenziato il polimorfismo nel numero e nelle dimensioni delle ripetizioni a livello di 12 *loci* MIRU sui 41 noti del ceppo di riferimento H37Rv, su cui è stata standardizzata la metodica (72). In base alle dimensioni degli amplificati viene definita la variante allelica di ogni *locus* del ceppo studiato. Ciascuno dei 12 *loci* presenta da 2 ad 8 alleli, generando così venti milioni di possibili combinazioni. Il pattern genotipico viene quindi espresso come un codice numerico a 12 cifre, corrispondente al numero di *VNTRs* presenti in ciascuno dei 12 *loci*. Negli ultimi anni si è assistito ad una ulteriore implementazione della metodica con la standardizzazione di pannelli a 15 ed a 24 *loci* (24 *VNTR*). Aspetti positivi della metodica *MIRU-VNTR* sono innanzitutto la semplicità, la rapidità di esecuzione, la necessità di esigue quantità di DNA micobatterico, estratto con una tecnica di lisi al calore senza successiva purificazione direttamente da colture. Non ultimo, l'automatizzazione mediante analisi al sequenziatore e successiva codifica dei pattern genotipici mediante un *software* dedicato Gene Mapper (Figura 22); ciò consente di poter quindi tipizzare simultaneamente fino a 96 isolati alla volta.

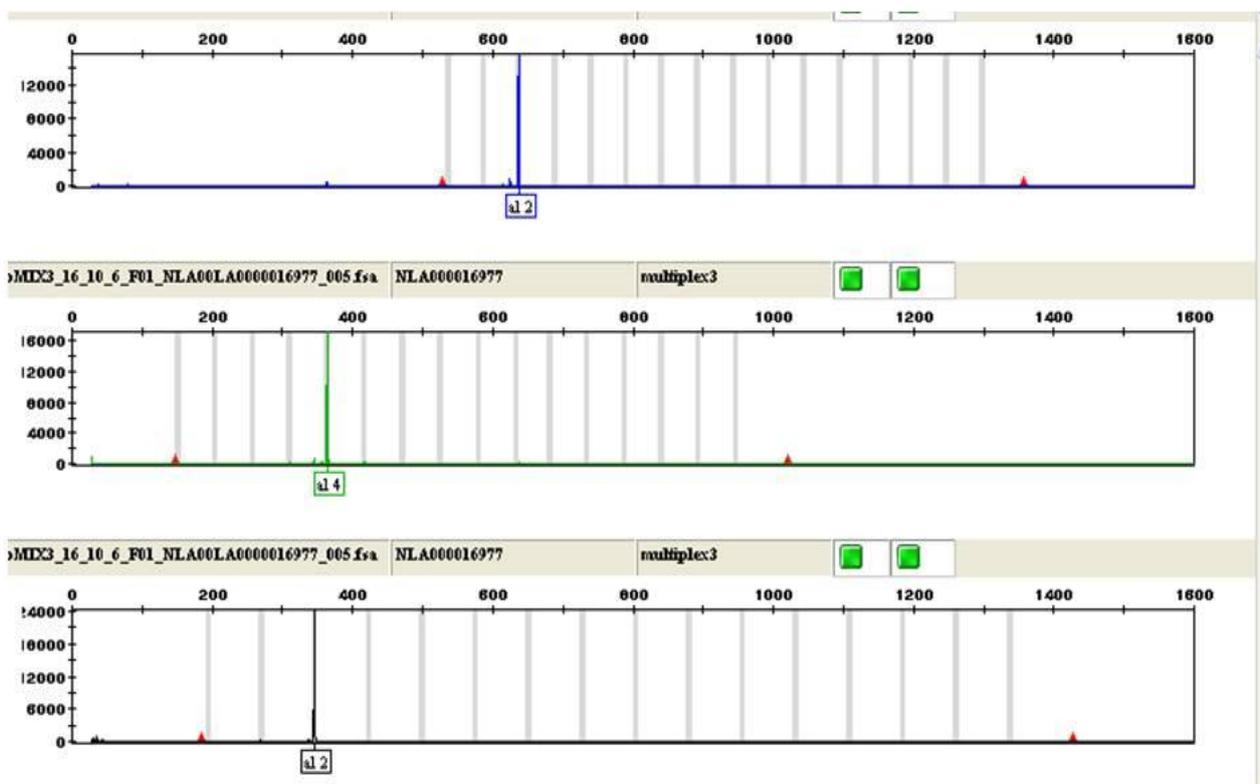


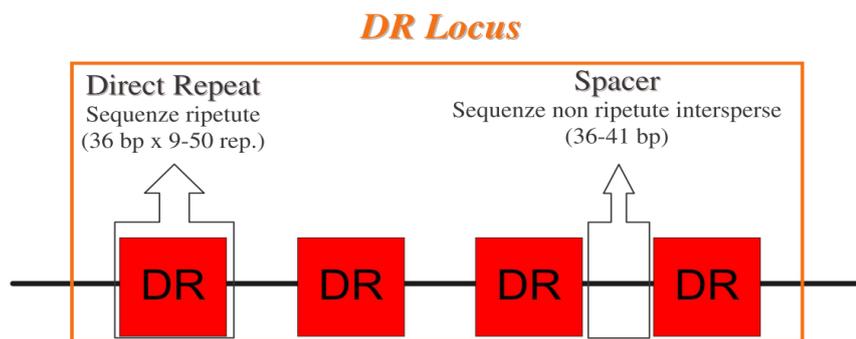
Figura 22 – Schermata del software Gene Mapper in cui sono visibili i picchi allelici di un campione.

## Analisi critica del metodo

Il potere discriminativo del *MIRU-VNTR* è stato ed è ancora oggi argomento di acceso dibattito in letteratura. Nei primi anni dall'introduzione di questo sistema di *DNA fingerprinting* la capacità discriminante della *MIRU* sembrava essere pari a quella della *IS6110 RFLP* fino ad allora ritenuto il *gold standard* (149,150). (106,107). Studi comparativi con lo spoligotyping del 2003 hanno evidenziato che i *cluster* definiti attraverso lo spoligotyping erano ripartiti in *sottocluster MIRU*; al contrario tutti gli isolamenti clinici raggruppati in *cluster* mediante *MIRU* appartenevano a specifici *cluster* definiti mediante spoligotyping. Il potere discriminativo espresso attraverso l'indice di Hunter-Gaston fu pari a 0,965 per lo spoligotyping e 0,988 per la *MIRU-VNTR* (108). Nel 2005 lo studio di Scott ha prodotto risultati divergenti dalle opinioni fino a quel momento diffuse circa la sensibilità e la specificità di spoligotyping e *MIRU*, evidenziando una bassa sensibilità ed una bassa specificità per entrambe le metodiche rispetto all'*RFLP* (111). Un lavoro del 2006 ha concluso che il potere discriminativo dell'analisi *MIRU-VNTR* è proporzionale al numero di *loci* valutati. In generale, quando solo 12 *loci* vengono valutati, la metodica è meno discriminante della genotipizzazione basata su *IS6110 RFLP* per isolati con molte copie di *IS6110* ma più discriminante per isolati con un basso numero di sequenze *IS6110*. Se vengono utilizzati più di 12 *loci* o l'analisi mediante *MIRU* è associata allo spoligotyping, allora il potere discriminativo diventa approssimativamente pari a quello dell'analisi *IS6110 RFLP* (151). Nel 2007 uno studio epidemiologico-molecolare condotto nella città di Amburgo, in un contesto a bassa incidenza di TB, tramite *IS6110 RFLP*, *MIRU* ottimizzata (cioè a 15 o 24 *loci*) e tramite l'associazione *MIRU - spoligotyping*. Ha evidenziato come il *MIRU* ottimizzato, soprattutto se combinato con lo spoligotyping, ha un valore predittivo superiore a quello dell' *IS6110 RFLP* (115). In sostanza dai più recenti studi del 2008 si può concludere che i risultati forniti dal *MIRU-VNTR* debbano tenere conto della distanza genetica. Infatti, in situazioni in cui è bassa l'incidenza della TB la distanza genetica tra isolati non correlati da un punto di vista epidemiologico è sufficiente per definire un ceppo sia mediante *RFLP* che mediante *MIRU*. Diversamente, in una condizione di alta incidenza, la continua evoluzione dei ceppi denota la debolezza propria di questi marcatori (116).

### 3.3.3 Spacer Oligonucleotide Typing

Lo *Spacer oligonucleotide typing*, più comunemente definita Spoligotyping è una tecnica di genotipizzazione molecolare introdotta nel 1993 ma sviluppata nel 1997 e più comunemente usata per caratterizzare gli isolati appartenenti a *M. tuberculosis complex*. Tale metodica basata anche'essa sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di amplificare nel DNA micobatterico il *locus* cromosomico DR (Direct Repeat Region) e a sua volta le molteplici sequenze ripetute contenute (DRs, *direct repeats*) di 36 paia di basi ciascuna separate da *spacer* (43 sequenze spaziatrici) non ripetitive della lunghezza di 36-41 paia di basi (Figura 23) (152,153).



**Figura 23 – Illustrazione della composizione del locus DR (154).**

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

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

- variazione di una o di poche ripetizioni contigue con la relativa sequenza *spacer* vicina, definita anche come *Direct Variable Repeats* (dovuta probabilmente proprio alla ricombinazione omologa tra DRs cromosomiche adiacenti o distanti)
- delezione degli spacer guidata dalla trasposizione di un elemento *IS6110* presente nel locus DR (151)(81)

Le ripetizioni DR non possono aggiungersi tra le sequenze, ma vengono perse irreversibilmente (151).

Gli eventi di delezione possono verificarsi più volte nel tempo e indipendentemente in ceppi non correlati; pertanto l'identico spoligotipo tra due ceppi può essere il risultato di un evento di evoluzione convergente (151,155). Il primo step della metodica consiste nell'amplificazione del locus DR per ogni campione avviene mediante una coppia di *primers* (DRa e DRb), uno dei quali biotinilato (DRa) all'estremità 5' (Figura 24) (156).

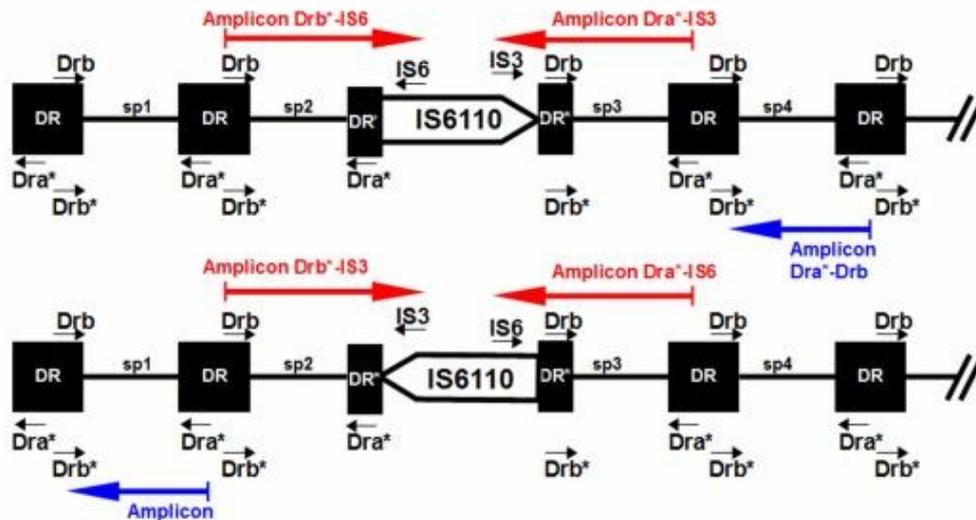


Figura 24 – Dimostrazione della direzione di amplificazione degli ampliconi (157).

Gli amplificati saranno adagiati singolarmente nei condotti di un miniblotter che permetterà l'ibridizzazione degli stessi perpendicolarmente con le sonde dei 43 oligonucleotidi specifici per ciascun DR *spacer* precedentemente legati in modo covalente alla Biodyne C (Figura 25). Tale membrana di nitrocellulosa attivata sulla quale è avvenuta la reazione di ibridizzazione, sarà successivamente incubata con streptavidina perossidasi (POD-coniugate), la quale è in grado di riconoscere e legare la biotina presente nei prodotti di PCR (reverse strand) ottenuti al primo step.

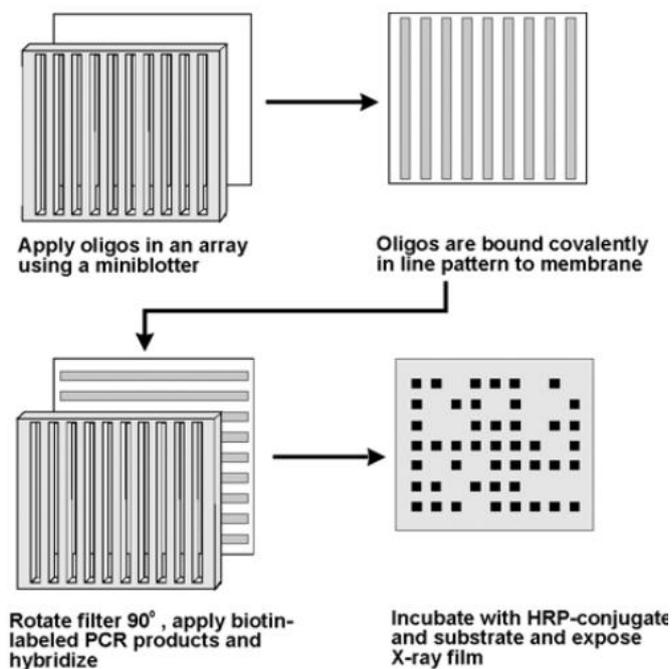
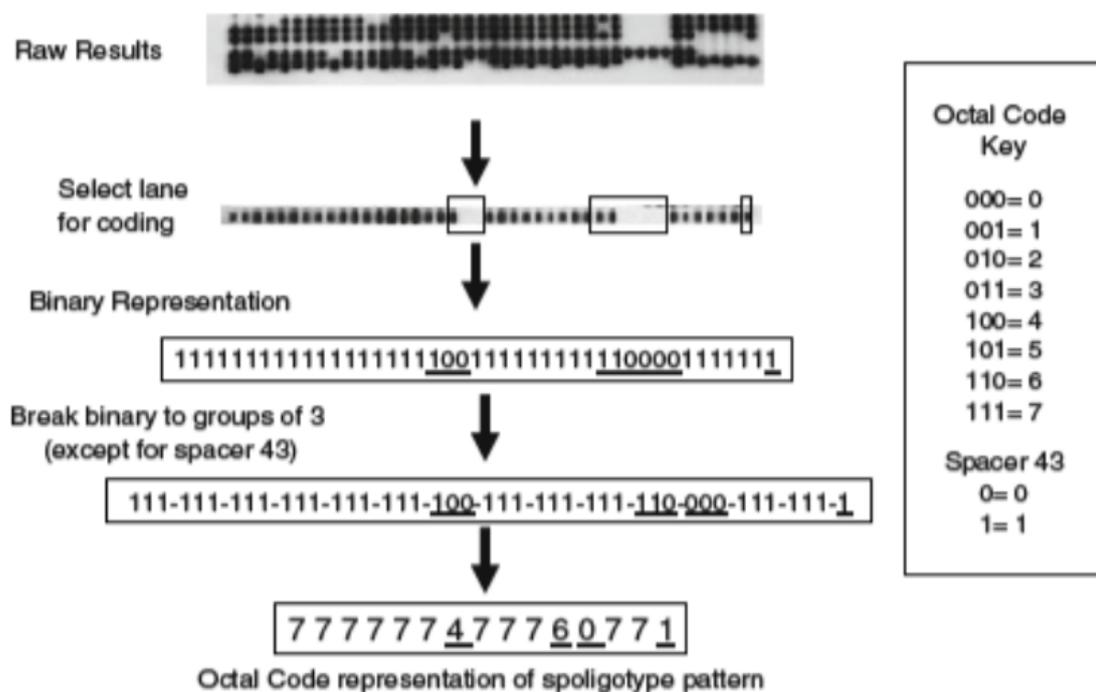


Figura 25 – Schema dell'ibridazione di oligonucleotidi e DNA micobatterico sulla membrana Biodyne C (158).

Per visualizzare il segnale di ibridizzazione è necessario un sistema di chemiluminescenza attraverso cui la perossidasi presente sulla streptavidina catalizza una reazione in grado di emettere luce, la quale sarà catturata mediante una autoradiografia della membrana su una lastra fotografica. L'analisi finale consiste nella decodifica della lastra ottenuta secondo un preciso schema. La presenza o l'assenza del segnale relativo ad ogni *spacer* nell'immagine fotografica viene registrata secondo un codice binario ottenendo una stringa numerica di 43 cifre iniziali; il segnale positivo è associato alla visualizzazione del quadrato nero in corrispondenza dello *spacer* e ad esso si attribuisce un valore pari a 1. Al contrario l'assenza di segnale è considerato come mancanza di *spacer* e ad esso è associato il valore 0.

La stringa numerica di 43 cifre verrà poi suddivisa a triplette, ad eccezione dell'ultima, così da ridurre a 15 cifre l'intero campione secondo un octal code (Figura 26).



**Figura 26 – Decodifica dalla stringa numerica a 43 cifre nel codice ottagonale a 13 cifre (158).**

A seguito dell'avvenuta decodifica i risultati ottenuti sono messi a confronto con campioni inseriti in database internazionali come SploDB4 che contengono dati di spoligotipi già conosciuti (ST), i quali a loro volta sono catalogati nel database in *lineage* e *sub-lineage* (79,159).

### **3.3.4 Costruzione di dendrogrammi con Software bioinformatici (160)**

Il tempo di evoluzione e di diffusione del *M. tuberculosis complex* rimane ancora ampiamente sconosciuto. Ad oggi le informazioni note sul pattern filogenetico di *M. tuberculosis* consistono nella suddivisione in 6 gruppi filogenetici (da *Lineage 1* a 6) secondo lo schema definito precedentemente da Gagneux & Small sulla base di marker come ampie sequenze polimorfiche (LSP: large sequence polymorphism) (161).

I sei lineages mostrano specifiche caratteristiche biogeografiche e sono stati distinti fra loro sulla base dell'evoluzione dei membri del *M. tuberculosis complex* e le loro popolazioni ospiti.

Una nuova analisi di tipo bioinformatico e filogenetico utilizza algoritmi di clusterizzazione che permettono la costruzione di alberi filogenetici calcolati su matrici di distanze come UPGMA e NJ. Da recenti studi (162) si evidenziano fenomeni di coesistenza di famiglie genotipiche specifiche di una area geografica ed altre appartenenti a paesi in cui la prevalenza di TB è maggiore.

Nel nostro caso specifico la costruzione di alberi filogenetici metterebbe in evidenza quali siano le famiglie genotipiche maggiormente diffuse nell'area Milanese e in generale in Italia, un paese ancora a bassa prevalenza di TB e le possibili relazioni di ceppi tra popolazione italiana e immigrata/straniera.

Un albero filogenetico è un grafico che mostra visivamente la collocazione temporale della separazione fra linee evolutive che, a partire da una data specie, ha portato alla formazione di due o più specie diverse attraverso una serie di biforcazioni.

In linea di principio anche un'unica linea che indica la successione temporale di una serie di specie è un albero filogenetico, ma all'atto pratico l'interesse predominante è quello di mostrare le relazioni evolutive fra due o più specie esistenti al giorno d'oggi o esistite in passato.

Un albero genetico propriamente detto deve possedere tali caratteristiche:

1. avere una radice che rappresento l'antenato comune a tutte le specie presenti nell'albero
2. le specie attualmente esistenti devono essere collocate su un'unica linea, che rappresenta l'epoca attuale
3. l'albero deve possedere una scala temporale di riferimento
4. le ramificazioni devono essere dicotomiche e datate
5. per quanto possibile dovrebbero essere indicate le specie estinte, le quali hanno dato origine a quelle attuali

Se si violano una delle condizioni sopra citate non si è più nelle condizioni di ottenere un vero albero filogenetico, ma una rappresentazione parziale, non necessariamente evolutivista, delle relazioni esistenti (o altre categorie tassonomiche, sequenze di DNA, gruppi sistematici, popolazioni). Tali grafici sono utili come intermedi per la costruzione di una vera filogenesi.

La violazione della prima condizione per la definizione di un vero albero filogenetico, ovvero la mancanza di una radice, sviluppa una rappresentazione grafica denominata dendrogramma.

Il termine dendrogramma (letteralmente "grafico ad albero") è molto utilizzato in sistematica biologica e nell'ambito dell'analisi dei gruppi (cluster analysis). Questa ultima è una tecnica della statistica multivariata volta ad individuare, dato un insieme di unità statistiche per le quali sono disponibili una o più serie di

osservazioni, determinati sottoinsiemi (gruppi), le cui unità sono mediamente più simili fra loro di quanto non lo sia ciascuna di esse ad ogni unità degli altri gruppi.

La natura statistica dei dendrogrammi fa sì che essi registrino solamente le somiglianze per come essi si manifestano nei dati. La lunghezza delle branche generate nel dendrogramma sono scalate in unità di distanza e disposte in parallelo all'asse delle ordinate per comodità.

Per ovviare al problema della mancanza di radice, il metodo di elezione è quello di includere nell'analisi il cosiddetto "outgroup", ovvero una specie che si sa per certo essersi separata filogeneticamente prima di tutte le altre. L'outgroup consente di interrompere il dendrogramma, ponendo una radice, nel segmento che lo collega al nodo da cui si diramano tutte le altre specie.

I metodi di costruzione dei dendrogrammi si possono classificare in due famiglie: quelle basate sulle matrici di distanza e quelli basati sulla condivisione dei caratteri.

Nel primo caso si calcola separatamente la distanza fra tutte le possibili coppie di specie ed il risultato assume la forma di una matrice quadrata i cui valori sulla diagonale sono pari a zero e positivi al di fuori della diagonale. Nel secondo caso invece i caratteri che sono condivisi da una o più specie vengono inclusi nell'analisi uno alla volta, dando luogo ad una gerarchia di ramificazioni senza che si passi attraverso il calcolo di una distanza.

I metodi basati sulle matrici di distanza sono più rapidi, ma trascurano l'informazione sulla condivisione di ciascun singolo carattere.

Nello specifico sono:

- **Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)** è un metodo iterativo che procede via via associando le sequenze o i cluster di sequenze più simili fra loro; si inizia scegliendo nella matrice la coppia con distanza minima e si traccia la prima dicotomia del dendrogramma unendo le due specie con un segmento la cui lunghezza è pari alla metà della loro distanza. Si prosegue ricalcolando la matrice, ridotta ad unità, in cui quella prima coppia è rappresentata da un unico gruppo e si ricerca una nuova coppia con distanza minima; si conduce l'analisi iterando tale procedimento fino a che la matrice scompare poiché sono rimasti solo i due ceppi finali. Il metodo UPGMA produce quindi dendrogrammi in cui le specie sono necessariamente allineati alla base.
- **Neighbour Joining (NJ)** anch'esso iterativo, in grado di minimizzare la lunghezza di ogni ramo basato sul minimum evolution criterion. L'approccio dell'algoritmo di NJ è simile a quello dell'UPGMA, ma la ricerca del "neighbor" (il vicino) di ciascuna specie viene effettuata non scegliendo la coppia con distanza minima, ma attraverso un processo di minimizzazione della somma di tutte le distanze fra le specie considerando tutte le coppie possibili. Si inizia con un albero a stella in cui tutte le branche sono della stessa lunghezza, e le diramazioni vengono poi risolte una alla volta. Il risultato finale è un dendrogramma in cui la lunghezza di ciascuna branca è proporzionale alla distanza media di ciascuna specie rispetto a tutte le altre. L'algoritmo di NJ è

considerato un buon compromesso fra velocità di esecuzione del calcolo e accuratezza del risultato; infine il NJ non è vincolato ad allineare le specie alla base.

Il limite di tali metodi consiste nella perdita di molteplici informazioni compresse nel calcolo delle distanze tra due specie ed espresse sottoforma di un singolo valore. In tal modo non è possibile risalire alle caratteristiche dei dati originali solamente dalle matrici di distanza.

Altri due metodi basati sulle matrici di distanze sono quello di Fitch – Margoliash (FM) e quello di Minimum Evolution (ME) proposti già prima della comparsa del NJ e tuttora in uso. Sono considerati molto più accurati del NJ, ma richiedono un tempo di calcolo maggiore e quindi all’atto pratico non evidenziano particolari vantaggi.

I metodi invece basati sulla condivisione dei caratteri offrono un grande vantaggio e cioè consentono l’inferenza sui caratteri delle specie ancestrali presenti sui nodi e non perdono informazioni, poiché utilizzano la matrice originale costituita da  $m$  caratteri \*  $n$  specie.

Per la costruzione dei dendrogrammi di NJ e UPGMA ci siamo avvalsi degli algoritmi presenti nella sezione dedicata del software MIRU-VNTR *Plus* disponibile online (163)

Per creare una nuova comparazione è necessario impostare i parametri della finestra di *Comparison Setting* al fine di creare una matrice di similarità, nel nostro caso basata su coefficiente di similarità Categorical (Values). È stato scelto questo tipo di coefficiente in quanto i dati importati nel database di partenza per l’analisi sono codici numerici a 24 cifre per MIRU-VNTR e 15 cifre per gli spoligo patterns. Una volta costruito il dataset dei campioni si procede alla vera e propria *Cluster Analysis* selezionando l’uso di valori di similarità per la comparazione, l’algoritmo di *NJ* o *UPGMA*, l’opzione di calcolare e mostrare l’*error flags* (deviazione standard associate a ogni cluster). Infine si seleziona l’opzione di *Cophenetic Correlation*, un parametro per esprimere la consistenza del cluster. Tale metodo calcola la correlazione tra il dendrogramma derivato da valori di similarità e la matrice di similarità.

### **3.4 Analisi Statistica**

#### **OBIETTIVO 1**

##### **Popolazione**

Per il primo obiettivo del nostro studio, sono stati presi in considerazione tutti i pazienti con diagnosi di TB e isolamento in coltura di *M.tuberculosis* e disponibilità dell'antibiogramma nell'arco temporale 1993-2010.

##### **Analisi dei dati.**

La valutazione della diffusione temporale, in base all'età anagrafica e in relazione con la coinfezione con HIV, non è stata oggetto di analisi statistica.

#### **OBIETTIVO 2**

##### **Popolazione**

Nell'analisi condotta sono stati messi a confronto i pazienti definiti MDR sulla base del risultato di antibiogramma e i pazienti non-MDR (sensibili o resistenti ad altri farmaci).

L'arco temporale scelto per l'analisi è quello a partire dal 1999 fino al 2010. La scelta di escludere il periodo precedente è stata dettata dal fatto che tale periodo (1993-1998) era stato caratterizzato da una serie di eventi epidemici principalmente a carico della popolazione TB/HIV+ ospedalizzata, il che poteva influenzare fortemente l'analisi statistica.

##### **Analisi statistica per campioni MDR**

Le variabili categoriche considerate per i gruppi in osservazione sono state: età, sesso, nazionalità, forma di TB, fattori di rischio, sierologia per HIV, positività all'esame microscopico, outcome a fine terapia antitubercolare.

Per quanto riguarda la nazionalità i pazienti sono stati suddivisi in base al continente di origine, considerando i pazienti cinesi separatamente dai restanti pazienti asiatici e suddividendo i pazienti europei in base alla provenienza dall'Europa dell'ovest (compresa l'Italia) o dall'Europa dell'Est (comprendente Albania, Bosnia, Bulgaria, Jugoslavia, Kosovo, Macedonia, Moldavia, Turchia, Romania, Serbia, Slovenia e Ucraina). I fattori di rischio sono stati suddivisi in fattori di tipo ambientale (contatto anche professionale con individui con TB bacillifera), sociale (detenzione in carcere, etilismo, senza fissa dimora, tossicodipendenza) e clinico (comorbidità come neoplasie, diabete, immunosoppressione, epatopatia cronica da HCV e altre malattie ad esclusione dell'HIV, che è stata considerata come variabile a sé stante).

Per questo primo obiettivo è stata scelta come variabile dipendente di riferimento il risultato dell'antibiogramma, mettendo quindi a confronto la popolazione di TB MDR vs non-MDR; è stata eseguita quindi un'analisi multinomiale univariata e l'odds ratio (ed il suo intervallo di confidenza al 95%) è stato calcolato quale stima del rischio relativo. Sono state analizzate le variabili per cui erano disponibili i dati per almeno il 90% dei pazienti.

L'effetto di ciascuna variabile significativa sul rischio analizzato è stato testato dapprima separatamente e poi congiuntamente in un modello di regressione logistica multipla (logistic regression stepwise). Un valore di  $p < 0,05$  è stato scelto come valore soglia di significatività statistica.

L'analisi statistica è stata condotta con SAS Enterprise Guide (Versione 5.1, Institute Inc, Cary North Carolina, USA).

### **OBIETTIVO 3**

#### **Popolazione**

Per le analisi di raggruppamento in *cluster* (*clustering*) sono stati considerati tutti gli episodi TB per cui era disponibile un ceppo isolato su cui era stato eseguito un test di genotipizzazione.

A questo scopo, abbiamo prediletto le sole metodiche di RFLP e MIRU-VNTR perché più sensibili rispetto alla metodica di Spoligotyping.

Le tecniche di RFLP e MIRU-VNTR, sono state utilizzate alternativamente in due differenti periodi temporali:

- la metodica RFLP è stata impiegata per la tipizzazione molecolare dei ceppi dal 1993 al 2008
- la tipizzazione MIRU è stata impiegata per la tipizzazione molecolare dei ceppi dal 2009 al 2010.

Anche per questa analisi però abbiamo preferito prendere in considerazione un periodo temporale ridotto (dal 1999-2010) per evitare l'influenza delle casistica appartenente all'epidemia di TB MDR precedentemente descritta.

Per i campioni MDR già tipizzati in RFLP e MIRU-VNTR di cui era però disponibile anche il dato di genotipizzazione con Spoligotyping è stato costruito un dendrogramma con metodo di UPGMA per validare ulteriormente l'appartenenza a specifici raggruppamenti in *cluster* di tali ceppi.

#### **Analisi statistica degli episodi di TB raggruppati in *cluster***

Per questo obiettivo le variabili indipendenti inserite nell'analisi sono state le medesime dell'univariata precedente con l'aggiunta del risultato di antibiogramma, mentre come variabile dipendente è stata scelta l'appartenenza ad un *cluster*. Anche per questo obiettivo è stata condotta un'analisi univariata e di regressione logistica multipla (logistic regression stepwise) con SAS Enterprise Guide (Versione 5.1, Institute Inc, Cary North Carolina, USA).

## **OBIETTIVO 4**

### **Popolazione**

Dai casi con antibiogramma, abbiamo selezionato i soli campioni che possedevano una tipizzazione molecolare con Spoligotyping. Per l'attribuzione ai *lineages* genotipici abbiamo preso in esame il codice numerico a 15 cifre generato mediante la metodica di Spoligotyping.

Le analisi sono state condotte prendendo in considerazione tutto il periodo dello studio (dal 1993 al 2009).

### **Analisi statistica per campioni appartenenti a *lineages* genotipici**

Le analisi univariate e di regressione logistica multipla condotte con SAS Enterprise Guide (Versione 5.1, Institute Inc, Cary North Carolina, USA) per questo scopo hanno preso in considerazione le variabili sopracitate per gli obiettivi precedenti. L'appartenenza ad ogni singolo *lineage* caratteristico per la popolazione oggetto del nostro studio è stata definita come variabile dipendente per ogni analisi effettuata e confrontata con la restante popolazione.

Le variabili dipendenti considerate tenevano conto dei dati clinici (forma TB, HIV, esame microscopico, ricorrenze, ABG), epidemiologici (età, nazionalità, sesso) e comportamentali dei pazienti (fattori di rischio).

## **OBIETTIVO 5**

### **Popolazione**

Per questo ultimo obiettivo, sono stati scelti i soggetti che presentavano due episodi di TB nel periodo 1993-2010, che risultavano guariti a conclusione del ciclo terapeutico al primo episodio. Per tali pazienti sono stati raccolti dati di tipo demografico (età, sesso, nazionalità, condizioni sociali), clinico (forma di TB e aderenza alla terapia) e caratteristiche di laboratorio (antibiogramma e coinfezione con HIV). A questi dati sono stati aggiunti quelli di 11 pazienti provenienti dall'istituto di malattie infettive degli Spedali Civili di Brescia.

La ricorrenza è stata definita nel caso in cui a seguito di cure con esito positivo al primo episodio, fossero ricomparsi segni clinici e radiologici tali da diagnosticare un nuovo episodio. Non sono stati considerati per questo obiettivo più di un episodio di ricorrenza per paziente.

A livello molecolare sono state impiegate le metodiche di RFLP nel periodo 1993-2008 e di spoligotyping e MIRU-VNTR per il 2009-2010.

Un paziente con ceppi di *M. tuberculosis* isolati da primo e secondo episodio, che risultavano differenti a livello di genotipizzazione molecolare sono quindi stati considerati come un nuovo episodio di TB dovuto a reinfezione esogena, quelli con il medesimo pattern genotipico come recidiva di TB.

## **Analisi statistica per ricorrenze**

Un modello di regressione logistica è stato usato per calcolare il rischio di sviluppare delle reinfezioni esogene. L'infezione con HIV e le variabili delle quali si è osservato una associazione in univariata con le reinfezioni esogene ( $p < 0.05$ ) sono state inserite in un modello statistico. L'odds ratio aggiustato ed il suo intervallo di confidenza al 95% è stato calcolato quale stima del rischio relativo. Valori di  $p$  di  $< 0.05$  bilaterali sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS (versione 20.0, Chicago, Illinois, USA).

## 4. Risultati

### 4.1 OBIETTIVO 1: Analisi temporale della diffusione dei casi di MDR nell'area milanese a partire dagli anni '90

#### Popolazione

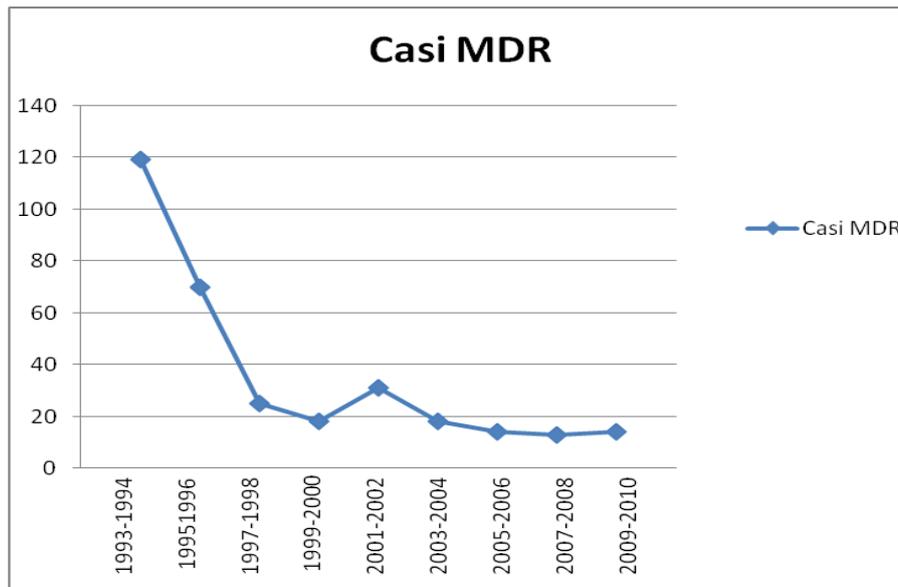
I pazienti dell'area Milanese con disponibilità del dato di antibiogramma ammontavano a un totale di 4237. I dati di sensibilità *in vitro* sono rappresentati in Tabella 2. Ai fini dell'analisi statistica sono stati confrontati i 322 pazienti (7,6%) con Multidrug Resistance (MDR) con i restanti casi (739 con monoresistenza o resistenze non classificabili come MDR e 3176 sensibili).

#### Analisi dei dati

Tabella 2 – Risultati di antibiogramma.

| Antibiogramma                               | N. casi | %     |
|---|---------|-------|
| MDR   | 322     | 7,6%  |
| Isoniazide monoresistenza                   | 149     | 3,5%  |
| Isoniazide + resistenza ad altri farmaci    | 172     | 4,1%  |
| Rifampicina monoresistenza                  | 4       | 0,1%  |
| Rifampicina + resistenza ad altri farmaci   | 63      | 1,5%  |
| Streptomicina monoresistenza                | 252     | 5,9%  |
| Streptomicina + resistenza ad altri farmaci | 4       | 0,1%  |
| Etambutolo o pirazinamide monoresistenza    | 95      | 2,2%  |
| Sensibile                                   | 3176    | 74,9% |

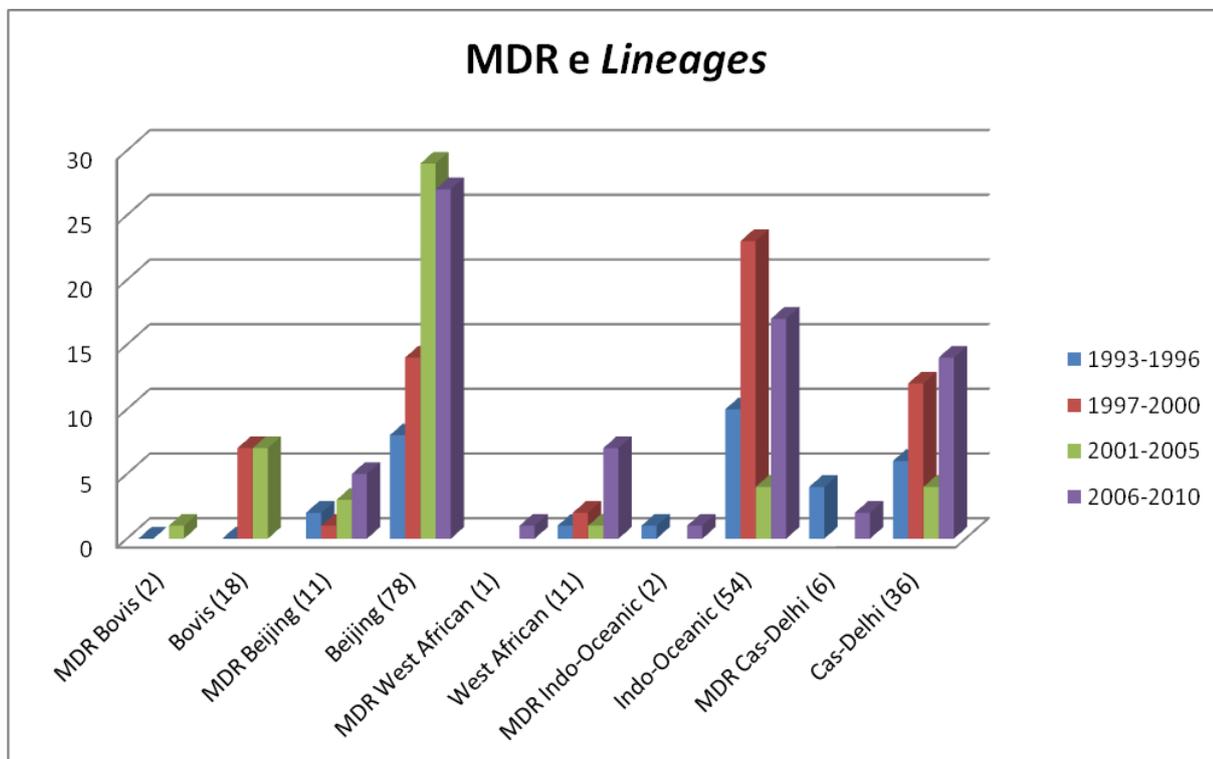
Nell'arco temporale considerato, la maggior parte dei casi di MDR-TB si è concentrata nel triennio 1993-1995: con 63 casi (19,2%) nel 1993, 56 casi (17,1%) nel 1994 e 42 casi (12,8%) nel 1995 (Grafico 1), in corrispondenza con l'insorgenza di un'epidemia nosocomiale documentata nei primi anni '90 in almeno due ospedali milanesi (164) in cui tutti i degenti erano affetti da HIV (165).



**Grafico 1 – Grafici di distribuzione dei casi di MDR.**

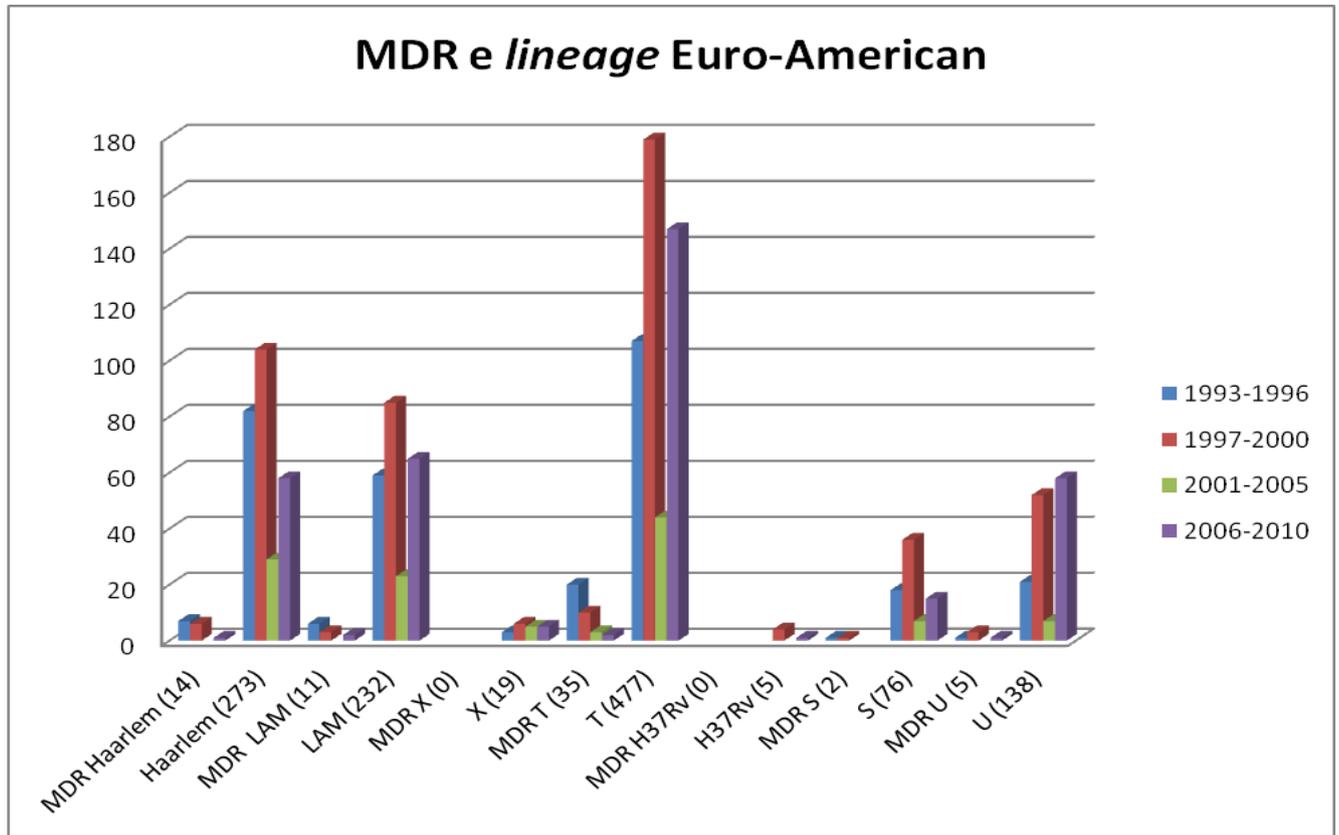
Gli anni 1993-95 corrispondono, come da atteso, anche alla maggior concentrazione di episodi di MDR-TB raggruppati in *cluster*, un dato che verrà ampiamente descritto nei paragrafi successivi.

I nostri ceppi, una volta genotipizzati con le tecniche di Spoligotyping e MIRU-VNTR sono stati attribuiti ai 6 principali *lineages* genotipici; la attribuzione dei casi di MDR-TB e la loro distribuzione nel tempo é rappresentata nei grafici 2 e 3.



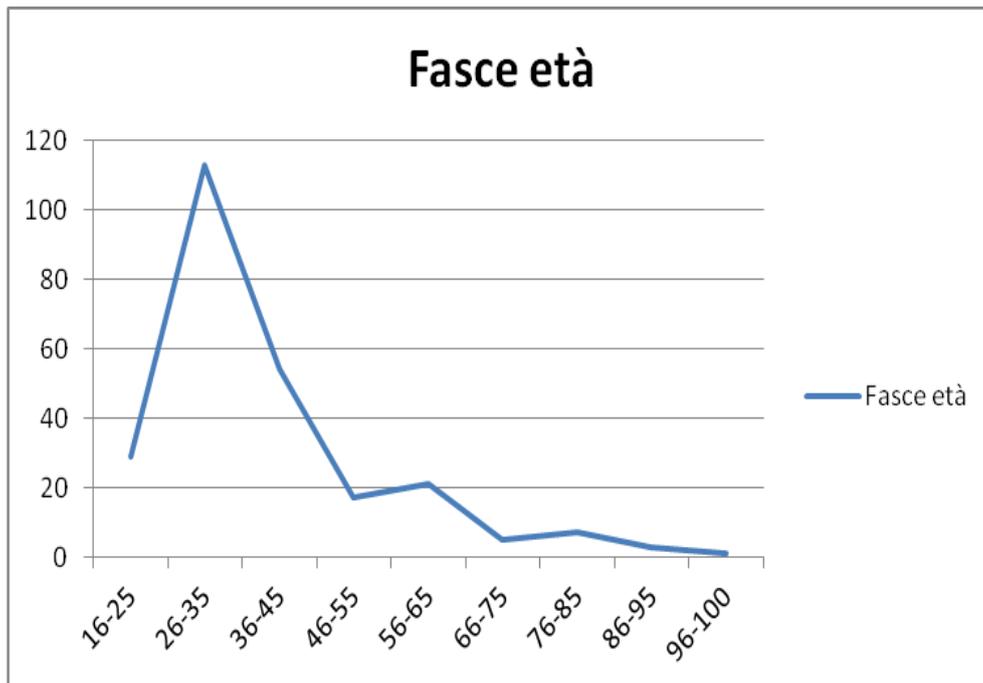
**Grafico 2 – Distribuzione dei ceppi MDR appartenenti ai *lineages* genotipici dal 1993 al 2010.**

Per il *lineage* Euro-American, il più numeroso nel nostro studio, è stato riprodotto un grafico a sé stante che scompone tale *lineage* nelle sottofamiglie Haarlem, LAM, X, T, H37Rv, S, U. Dall'osservazione dei dati si può notare che la popolazione MDR si è distribuita maggiormente all'interno del *sublineage* Beijing appartenente al *lineage* East-Asian (con un andamento costante nel tempo) e del Cas/Delhi (con una concentrazione di casi soprattutto nel primo quinquennio).



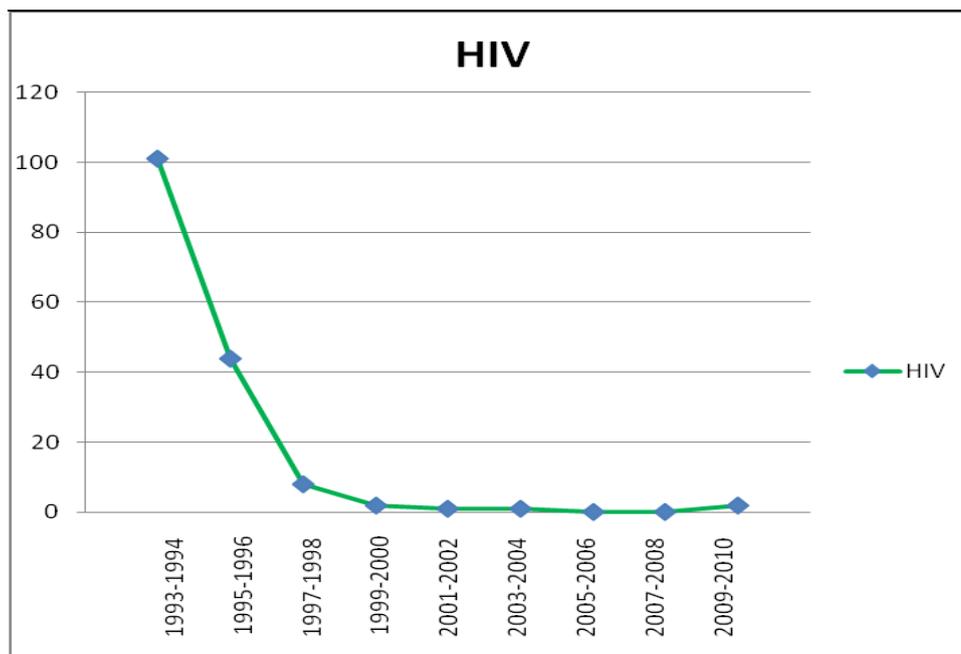
**Grafico 3 - Distribuzione dei ceppi MDR appartenenti al *lineage* Euro-American dal 1993 al 2010.**

Descrivendo più nello specifico la categoria degli MDR, un'elevata percentuale degli isolati erano soggetti di sesso maschile (240/322; 74,5%). Globalmente, l'età mediana di insorgenza dell'episodio di TB (nei 249/322 pazienti per il quale il dato era presente) era di 34 anni ( $38,3 \pm 14,8$ ; range 16-96). La maggior parte dei casi si concentrava nelle età comprese tra i 16 anni e i 45 anni: 29/249 casi tra i 16 ai 25 anni (11,6%), 113/249 casi tra i 26 e i 35 anni (45,4%) e 54/249 casi tra i 36 e i 45 anni di età (21,7%) (Grafico 4).



**Grafico 4 – Distribuzione dei casi sulla base dell'età anagrafica dei pazienti inseriti in analisi**

La maggior parte dei casi si registrava in pazienti HIV (159/319, 49,8%), ma questo dato si riferisce in particolare ai primi anni '90, riducendosi negli anni successivi al 1999: tale distribuzione segue l'andamento dell'epidemia nosocomiale già citata e delle variazioni epidemiologiche nella popolazione con HIV, conseguente all'introduzione della terapia HAART (Grafico 5).



**Grafico 5 - Distribuzione dei casi di HIV positivi.**

La maggioranza dei pazienti con MDR-TB erano di nazionalità italiana (216/310 casi, 69,7%). Tra gli stranieri prevalevano i soggetti provenienti dal continente americano (40/94, 45,5%), di cui 33/40 di origine Peruviana, dal continente asiatico 19/94 (20,2%), dal continente africano 18/94 (19,1%), e infine dal resto Europa 17/94 (18,1%), di cui 10/17 dalla Romania.

Il dato relativo alla localizzazione della malattia tubercolare era disponibile per 265/322 casi (82,3%).

Nello specifico la forma di MDR-TB più frequente era quella polmonare (200/265, 75,5%), seguita dalle forme disseminate (34/265, 12,8%) e dalle forme extrapolmonari (29/265; 11,0%).

Il dato clinico relativo all'esito finale del trattamento anti-TB era disponibile solo per 161 pazienti. I risultati osservati documentano che solo 46/161 pazienti (28,6%) erano guariti a seguito del trattamento, mentre la maggioranza (115/161; 71,4%), erano deceduti entro 1 anno dalla introduzione del trattamento anti-TB.

## **4.2 OBIETTIVO 2: Confronto tra le caratteristiche cliniche dei pazienti MDR e pazienti non-MDR**

### **Popolazione**

L'analisi descrittiva condotta ha messo a confronto 108 pazienti con MDR-TB con 3029 pazienti non-MDR (sensibili o resistenti ad altri farmaci) osservati nell'arco temporale scelto per l'analisi (dal 1999 fino al 2010) (Tabella 3).

Dall'analisi univariata le variabili che risultavano associate alla MDR-TB sono state lo sviluppo di una forma di TB polmonare e gli episodi di TB ricorrente. Viceversa, i pazienti di origine italiana (o provenienti dall'Europa occidentale) e con forme di TB extrapolmonare (non linfonodale), avevano un minor rischio di sviluppare una MDR-TB.

Il dato clinico sull'esito del trattamento anti-TB era disponibile in una percentuale ridotta di casi (1783/3137 casi, 56,8%). Tra costoro, un esito sfavorevole (decesso o fallimento terapeutico) si era verificato in 20/42 pazienti con TB-MDR (47,6%) e in 90/1741 individui (5,2%) con TB non-MDR ( $p = <0,01$ ).

Alla successiva analisi di regressione logistica le variabili risultate fattori predittivi per un episodio di MDR già significative in univariata, sono state riconfermate dai valori di aOR (Tabella 4). Più nello specifico, il rischio di sviluppare una MDR-TB era aumentato di 5 volte nei casi di TB ricorrente ed era anche associato alle forme di TB polmonare (aOR 5,2; 95% CI 1,6-16,5). L'analisi multivariata ha poi evidenziato la correlazione tra alcune comorbidità (diverse da HIV) e la MDR TB (aOR 2,5; 95% CI 1,1-5,7), con particolare riferimento al diabete mellito, patologia documentata in 4 pazienti con MDR-TB.

La nazionalità italiana (o comunque europea occidentale) era, invece, associata a un minor rischio di sviluppare una forma di MDR-TB (aOR 0,3; 95% CI 0,2-0,6). Nessuna tra le provenienze geografiche extraeuropee mostrava, comunque, un rischio significativamente maggiore di sviluppare una MDR-TB rispetto alle altre.

**Tabella 3 - Analisi univariata MDR vs non-MDR (periodo 1999-2010).**

|  | <b>non-MDR<br/>(n=3029)</b> | <b>MDR<br/>(n =108)</b> | <b>p-value</b>  |
|--|-----------------------------|-------------------------|-----------------|
| Età <40 anni, n (%)                        | 1492/2504 (59,6%)           | 53/89 (59,6%)           | 0,9             |
| Sesso Maschile, n (%)                      | 1819/2937 (61,9%)           | 64/105 (60,9%)          | 0,8             |
| <b>Origine</b>                             |                             |                         |                 |
| Italia ed Europa occidentale, n (%)        | 1326/2860 (46,4%)           | 36/101 (35,6%)          | <b>0,03</b>     |
| Est-Europa, n (%)                          | 254/2860 (8,9%)             | 13/101 (12,9%)          | 0,2             |
| Asia (non-Cina), n (%)                     | 233/2860 (8,1%)             | 9/101 (8,9%)            | 0,8             |
| Cina, n (%)                                | 61/2860 (2,1%)              | 5/101 (4,9%)            | 0,06            |
| Sud-America, n (%)                         | 581/2860 (20,3%)            | 25/101 (24,7%)          | 0,3             |
| Africa, n (%)                              | 405/2860 (14,2%)            | 13/101 (12,9%)          | 0,7             |
| <b>Fattori di rischio</b>                  |                             |                         |                 |
| Precedente esposizione, n (%)*             | 185/2596 (7,1%)             | 11/92 (11,9%)           | 0,08            |
| Fattori di rischio sociale, n (%)#         | 147/2596 (5,7%)             | 2/92 (2,2%)             | 0,1             |
| HIV, n (%)                                 | 242/2980 (8,1%)             | 6/106 (5,7%)            | 0,4             |
| Altre comorbidità, n (%)                   | 154/2596 (5,9%)             | 8/92 (8,7%)             | 0,3             |
| <b>Coinvolgimento clinico</b>              |                             |                         |                 |
| TB Polmonare, n (%)                        | 2175/2827 (76,9%)           | 89/95 (93,7%)           | <b>&lt;0,01</b> |
| TB Extrapolmonare (non linfonodale), n (%) | 367/2827 (13,0%)            | 1/95 (1,1%)             | <b>&lt;0,01</b> |
| TB Linfonodale, n (%)                      | 23/2827 (0,8%)              | 1/95 (1,1%)             | 0,8             |
| TB Disseminata, n (%)                      | 262/2827 (9,3%)             | 4/95 (4,2%)             | 0,09            |
| Esame microscopico positivo, n (%)         | 1410/1978 (71,3%)           | 57/72 (79,2%)           | 0,1             |
| Ricorrenze, n (%)                          | 195/2818 (6,9%)             | 32/98 (32,6%)           | <b>&lt;0,01</b> |

**Legenda:** MDR = multifarmaco resistenza, HIV = Virus Immunodeficienza Umana, # Alcolismo, uso di droghe, senza fissa dimora, carcere, \*contatto recente con casi di TB.

**Tabella 4 - Analisi multivariata MDR vs non-MDR dal 1999-2010.**

|              | <b>OR (95% CI)</b> | <b>p-value</b>  |
|--------------|--------------------|-----------------|
| Europa       | 0,3 (0,2-0,6)      | <b>&lt;0,01</b> |
| Comorbidità  | 2,5 (1,1-5,7)      | <b>0,02</b>     |
| TB Polmonare | 5,2 (1,6-16,5)     | <b>&lt;0,01</b> |
| Ricorrenze   | 5,2 (3,0-9,1)      | <b>&lt;0,01</b> |

**Legenda:** OR = Odds Ratio, CI = Intervallo di Confidenza, TB = tubercolosi, p = probabilità statistica

### **4.3 OBIETTIVO 3: Descrizione dei principali cluster di pazienti MDR e analisi di fattori di rischio**

#### **Popolazione**

Sono risultati disponibili i dati di tipizzazione tramite RFLP di 1995 ceppi dal 1993 al 2008 e tramite MIRU per 141 ceppi dal 2009 al 2010.

La quasi totalità dei ceppi sottoposti a tipizzazione con MIRU (140 su 141) avevano i dati molecolari relativi anche a RFLP e spoligotyping . Per questi isolati è stato possibile costruire dendrogrammi con metodo UPGMA con l'intento di verificare la medesima aggregazione in *cluster* dei nostri campioni.

#### **Analisi descrittiva**

Complessivamente, in tutto il periodo dello studio 1993-2010, stando ai dati ottenuti con la metodica RFLP e MIRU-VNTR, 143/222 ceppi MDR (64,4%) erano aggregati in *cluster*, mentre i restanti 79 erano ceppi sporadici (non appartenenti a nessun raggruppamento di casi). Tra i ceppi appartenenti a *cluster*, il 72,7 % dei campioni (104 casi) è risultato aggregarsi in 3 *cluster* principali arbitrariamente denominati **D**, **E**, **M** (Tabella 5). Un quarto *cluster*, denominato **B**, che includeva 10 casi di MDR-TB, è stato definito dalle sole metodiche di Spoligotyping e MIRU-VNTR.

Il *cluster D* è risultato essere quindi quello più numeroso ed è stato l'artefice dell'epidemia nosocomiale riscontrata negli ospedali milanesi negli anni '90 e diffusosi anche nelle provincie limitrofe, come dimostrato dalla tipizzazione di 17 ceppi MDR della zona di Varese, in cui erano emersi due differenti spoligotipi, di cui uno appartenente al *cluster D* degli MDR della zona milanese e un nuovo spoligotipo (777777760060771 SIT164) relativo alla famiglia T1.

Un secondo *cluster* riconducibile agli MDR è quello definito **E1-E2**, un gruppo ridotto in termini numerici a solo 6 casi ma con caratteristiche differenti rispetto agli altri finora analizzati. È un cluster di episodi concentrati negli anni 1997-98 (4/6; 66,6%), in pazienti di età più avanzata compresa tra i 56 e 70 anni (4/6; 66,6%). La forma principale è quella polmonare (4/6; 66,6%). A livello molecolare questo ultimo cluster è evidenziato dallo spoligotipo SIT 53 e pattern 77777777760771 e *lineage* T1.

Il *cluster M* invece è composto da 10 soggetti, per lo più maschi (8/10; 80%), italiani (9/10; 90%), identificabili nell'anno 1995 (8/10; 80%). Le forme dei soggetti facenti parte di questo *cluster* risultano per lo più di tipo polmonare (3/6; 50%). La tipizzazione molecolare è univoca, in quanto lo spoligotipo ricorrente è 777740017760771, classificato come SIT159 e denominato come T1 TUSCANY VARIANT. La metodica di MIRU-VNTR ha classificato questo gruppo appartenente alla famiglia LAM con il pattern 1243261532243224123262.

Il **cluster B** è costituito da ceppi attribuibili al *sub-lineage* BEIJING in base alle metodiche di Spoligotyping e MIRU-VNTR. Si tratta di un *cluster* caratterizzato dalla persistenza nel tempo in quanto mantiene la sua fitness negli anni (2005-2009, 6/10; 60%). La forma polmonare è risultata essere quella predominante con 9/10 casi. La provenienza dei pazienti appartenenti a questo raggruppamento è riconducibile al continente asiatico solo in una minoranza di casi (5/11, 45,5%). La genotipizzazione molecolare è univoca nella definizione dello spoligotipo SIT 190 e profilo 000000000003771, lo spoligotipo identificativo della famiglia Beijing.

**Tabella 5 – Caratteristiche dei principali raggruppamenti in *cluster* dei ceppi MDR TB (periodo 1993-2010).**

|                               | <b>cluster D (88 casi)</b>   | <b>cluster M (10 casi)</b>                            | <b>cluster E1-E2 (6 casi)</b>                              | <b>cluster B (11 casi)</b>                  |
|-------------------------------|--|---|--|---|
| <b>Sesso</b>                  | maschi (68/88; 77,3%)  | maschi (8/10; 80%),                                   | maschi 6/6 (100%)  | maschi (7/10; 70%)                          |
| <b>Nazionalità</b>            | Italiani (83/87; 95,4%)  | Italiani (9/10; 90%),                                 | Italiani (5/6; 83,3%),                                     | Italiani: 1/11 (9,1%)                       |
| <b>Periodo</b>                | 1993-1995 (81/88; 92,04%),   | 1995 (8/10; 80%                                       | 1997-98 (4/6; 66,7%),                                      | 2006-2009 5/11 (45,5%)                      |
| <b>Età</b>                    | 26-35 anni (41/63; 65,1%)  | nd  | 56-70 anni (4/6; 66,7%)                                    | 26-35 anni (5/10; 50%)                      |
| <b>Fattore di rischio</b>     | Tossicodipendenza<br>42/65 (64,6%)   | Nessuno 6/10 (60%)                                    | Nessuno 6/6 (100%)   | Nessuno (8/10; 80%)                         |
| <b>Forma di TB prevalenti</b> | Polmonare (44/65; 67,7%)   | Polmonare (3/6; 50%)<br>Extrapolmonare(2/6; 33,3%)    | Polmonare (4/6; 66,7%)                                     | Polmonare (9/10; 90%)                       |
| <b>Tipologia caso</b>         | Nuovi episodi 66/78 (84,6%)<br>Recidive 12/78 (15,4%)  | Nuovi episodi (8/10; 80%).                            | Nuovi episodi (5/6; 83,3%)                                 | Nuovi episodi (8/10; 80%)                   |
| <b>Esito finale</b>           | Guariti 5/51 (9,8%)  | Guariti: nd   | Guariti: 0/5 (0,0%)  | Guariti 3/9 (33,3%)                         |
| <b>HIV-positività</b>         | 77/88 (87,5%)  | 1/10 (10%)  | 2/6 (33,3%)  | 2/11 (18,2%)                                |
| <b>Spoligotyping</b>          | <b>CAS-DELHI</b><br>SIT1346-703777640003770<br>SIT1203-703777640003171<br><b>H1e H4</b><br>SIT47- 77777774020771<br>SIT262-77477777420771<br><b>Orphan</b> 703777720001771 | <b>T1 TUSCANY VARIANT</b><br>SIT159 - 777740017760771 | <b>T1</b><br>SIT53-77777777760771                          | <b>Beijing</b><br>SIT 190 - 000000000003771 |
| <b>MIRU-VNTR (similarità)</b> | 224425133533422244223354<br>CAS-DELHI (0,04)   | 124326153224323224123262<br>LAM (0,0)                 | 223325143336234334422361<br><i>sub-lineage</i> Ghana (0,0) | 223325153533445644423382<br>Beijing - (0,0) |

**Legenda:** MDR = multifarmaco resistenza, HIV = Virus Immunodeficienza Umana, TB = tubercolosi, Spoligotyping = Spacer Oligonucleotide Typing, MIRU-VNTR = Micobacterial Interpersed Repetitive Units Variable Number Tandem Repeats, nd = dato non disponibile

## Costruzione di dendrogrammi dei *lineages* caratterizzanti i casi MDR

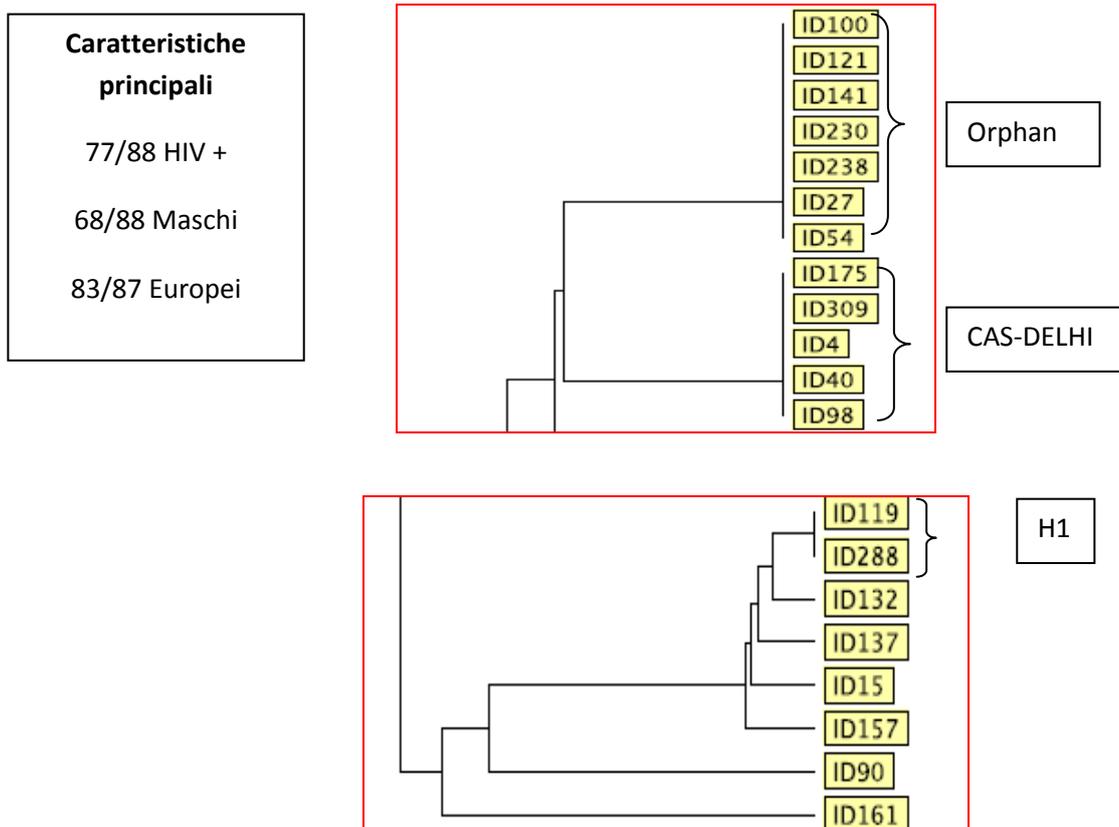
Per il nostro progetto abbiamo voluto concretizzare il valore epidemiologico dei nostri dati, costruendo dendrogrammi principalmente con metodo UPGMA con il programma MIRU-VNTR plus basandoci sui dati di genotipizzazione molecolare di Spoligotyping e MIRU-VNTR.

Come atteso i nostri campioni che erano coinvolti nei *cluster* più numerosi D, M e B sono stati riprodotti perfettamente nel dendrogramma comprensivo di tutti i casi MDR.

Qui di seguito quindi sono riportate le porzioni di albero che ritraggono i *cluster* di nostro interesse e le relative appartenenze alle famiglie genotipiche di Spoligotyping (Grafici 6, 7 e 8).

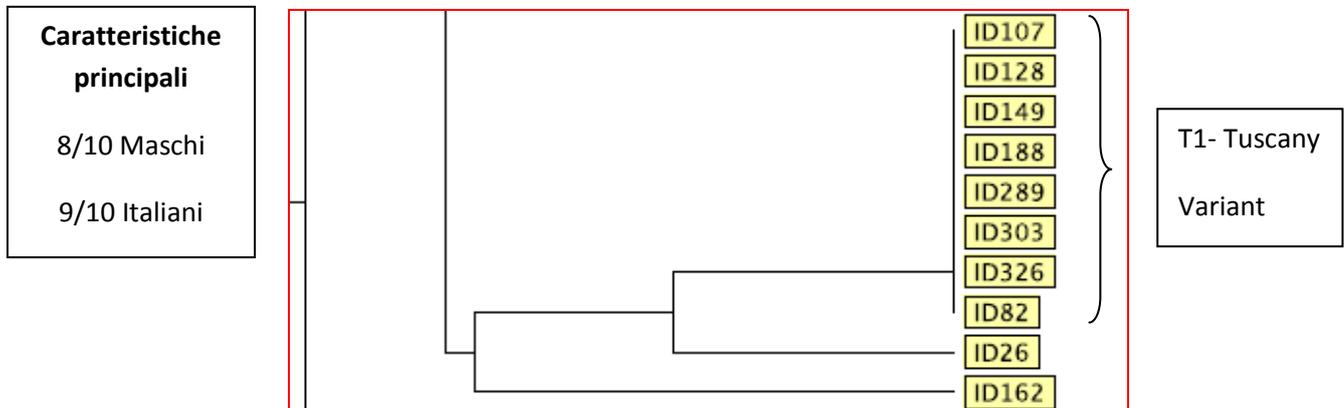
**Grafico 6 - Ceppi cluster D MDR in dendrogramma con metodo UPGMA**

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)



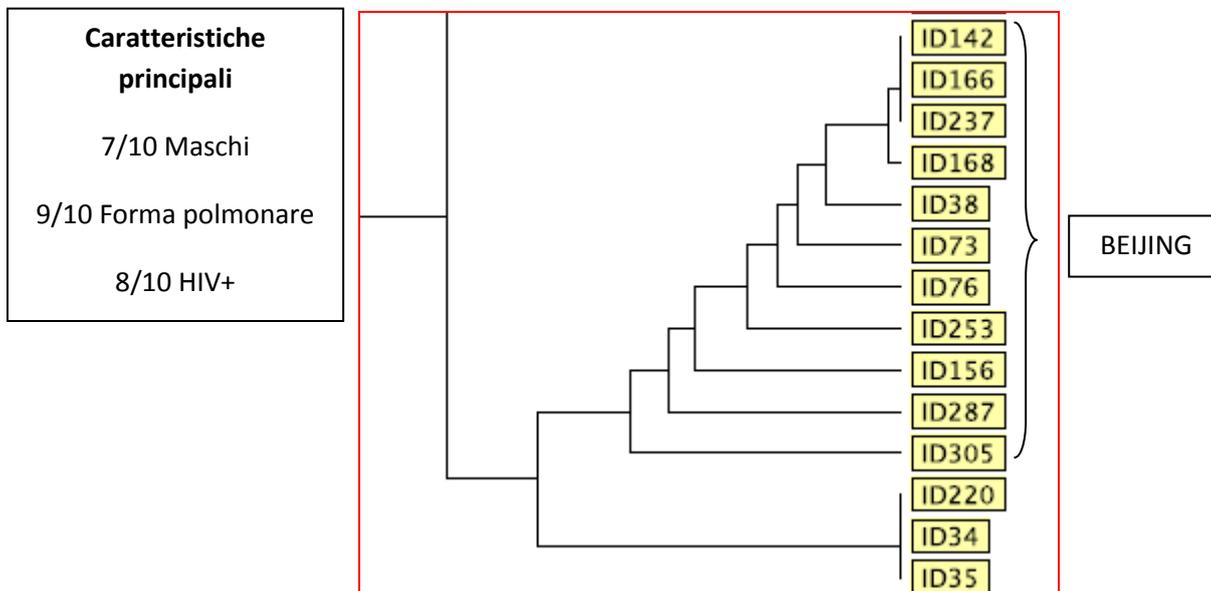
**Grafico 7 - Ceppi cluster M MDR in dendrogramma con metodo UPGMA**

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)



**Grafico 8 - Ceppi cluster BEIJING MDR in dendrogramma con metodo UPGMA**

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical (1), Spoligo: Categorical (1)



## Analisi dei dati

La popolazione oggetto di questa nuova analisi ha preso in considerazione tutti gli isolati di TB la cui genotipizzazione è stata effettuata con la metodica di RFLP nel periodo temporale ridotto dal 1999-2008, che comprendeva una casistica complessiva composta da 1046 casi (Tabella 6).

All'analisi univariata l'esito positivo alla ricerca dei bacilli alcol-acido resistenti all'esame microscopico mostrava un'associazione con il rischio di appartenere a raggruppamenti di casi con il medesimo genotipo ( $p=0,02$ ). Viceversa, l'appartenenza alle nazioni dell'Est Europa (soprattutto Romania) era inversamente correlato all'appartenenza a cluster ( $p \leq 0,01$ ) (Tabella 6).

Anche il dato della multifarmacoresistenza era al limite della significatività statistica ( $p = 0,06$ ), ma non veniva confermato dall'analisi multivariata, che confermava l'assenza di una significatività statistica dell'associazione (OR 1,8; e CI 95% 0,9-3,6  $p=0,07$ ).

Le altre due variabili, invece, confermavano la significatività statistica anche alla analisi multivariata (Tabella 7): la positività all'esame microscopico con un rischio quasi doppio rispetto all'esame microscopico negativo (aOR 1,9; CI 95% 1,1-3,4) di appartenere ad una *cluster* genotipico e la provenienza dalla Romania e da altri paesi dell'Est Europa con un rischio di 10 volte inferiore (aOR 0,09; CI 95% 0,01-0,7) rispetto alle altre nazionalità.

**Tabella 6- Univariata Cluster vs Non-Cluster dal 1999 al 2008.**

|  | <b>non-CLUSTER<br/>(n=878)</b> | <b>CLUSTER<br/>(n = 168)</b> | <b>p-value</b>  |
|--|--------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Età <40 anni, n (%)                        | 423/714 (59,2%)                | 79/144 (59,9%)               | 0,3             |
| Sesso Maschile, n (%)                      | 528/867 (60,9%)                | 102/163 (62,6%)              | 0,7             |
| <b>Origine</b>                             |                                |                              |                 |
| Italia e Europa occidentale, n (%)         | 426/837 (50,9%)                | 84/160 (52,5%)               | 0,7             |
| Est-Europa, n (%)                          | 62/837 (7,4%)                  | 3/160 (1,9%)                 | <b>&lt;0,01</b> |
| Asia (non-Cina), n (%)                     | 52/837 (6,2%)                  | 13/160 (8,1%)                | 0,4             |
| Cina, n (%)                                | 18/837 (2,1%)                  | 6/160 (3,7%)                 | 0,2             |
| Sud-America, n (%)                         | 160/837 (19,1%)                | 34/160 (21,2%)               | 0,5             |
| Africa, n (%)                              | 119/837 (14,2%)                | 20/160 (12,5%)               | 0,5             |
| <b>Fattori di rischio</b>                  |                                |                              |                 |
| Esposizione precedente, n (%)*             | 48/803 (6,0%)                  | 14/156 (9,0%)                | 0,1             |
| Fattori di rischio sociali, n (%) #        | 36/803 (4,5%)                  | 7/156 (4,5%)                 | 0,9             |
| HIV, n (%)                                 | 57/878 (6,5%)                  | 9/168 (5,4%)                 | 0,6             |
| Altre comorbidità, n (%)                   | 36/803 (4,5%)                  | 6/156 (3,8%)                 | 0,7             |
| <b>Coinvolgimento clinico</b>              |                                |                              |                 |
| TB Polmonare, n (%)                        | 651/825 (78,9%)                | 117/158 (74,1%)              | 0,2             |
| TB Extrapolmonare (non linfonodale), n (%) | 102/825 (12,4%)                | 26/158 (16,5%)               | 0,2             |
| TB Linfonodale, n (%)                      | 5/825 (0,6%)                   | 0/158 (0,0%)                 | 0,3             |
| TB Disseminata, n (%)                      | 67/825 (8,1%)                  | 15/158 (9,5%)                | 0,6             |
| Esame microscopico positivo, n (%)         | 399/563 (70,9%)                | 85/104 (81,7%)               | <b>0.02</b>     |
| MDR, n (%)                                 | 34/878 (3,9%)                  | 12/168 (7,1%)                | 0.06            |
| Ricorrenze, n (%)                          | 63/850 (7,4%)                  | 14/161 (8,7%)                | 0,6             |
| Esito finale (a 1 anno), n (%)             | 32/508 (6,3%)                  | 5/107 (4,7%)                 | 0,5             |

**Legenda:** MDR = multifarmaco resistenza, HIV = Virus Immunodeficienza Umana, # Alcolismo, uso di droghe, senza fissa dimora, carcere, \*contatto recente con casi di TB.

**Tabella 7- Multivariata Cluster vs Non-Cluster dal 1999 al 2008.**

|                             | <b>OR (95% CI)</b> | <b>p-value</b> |
|-----------------------------|--------------------|----------------|
| Est-Europa                  | 0,09 (0,01-0,7)    | <b>0,02</b>    |
| Esame microscopico positivo | 1,9 (1,1-3,4)      | <b>0,01</b>    |

**Legenda:** OR = Odds Ratio, CI = Intervallo di Confidenza, p = probabilità statistica

#### **4.4 OBIETTIVO 4: Ricerca di associazioni fra le caratteristiche dei pazienti MDR con i differenti lineages di *M. tuberculosis***

##### **Popolazione**

Gli episodi di TB con disponibilità dell'antibiogramma e che possedevano una tipizzazione molecolare con spoligotyping erano pari a 2256. Di questi, 1417 casi (62,8%) con genotipizzazione in Spoligotyping avevano un'attribuzione ad uno spoligotipo presente nel database SpolDB4 (166-168). Dalle analisi successive sono stati esclusi i restanti 839 ceppi che, avendo un pattern di spoligotyping non riconducibile ad un particolare spoligotipo, vengono definiti "orfani".

##### **Analisi dei dati**

Ai 6 *lineages* maggiori sono state attribuite le appartenenze dei 1417 casi come segue: Euro-American (LAM, X, T, S, U, H, H37Rv) 1220 (86,1%), East-Asian (Beijing) 78 (5,5%), Indo-Oceanic (EAI Manilla e MANU) 54 (3,8%), CAS/Delhi e CAS/Kili 36 (2,5%), Bovis 18 ceppi (1,3%) e West Africans 11 (0,8%). La distribuzione temporale dei 6 *lineages* è rappresentata nei Grafici 2 e 3.

Mettendo a confronto gli antibiogrammi e i *lineages* di appartenenza, le famiglie genotipiche che mostravano una maggior predisposizione alla presenza di multi farmaco resistenza erano il CAS-Delhi e l'East-Asian (Tabella 8). Viceversa, i *lineages* Euro-American ed Indo-oceanic avevano una minor propensione allo sviluppo di MDR-TB.

**Tabella 8 – Appartenenza alle famiglie genotipiche sulla base dell'antibiogramma.**

| <b>Lineage</b>      | <b>MDR</b>       | <b>non-MDR</b>     |
|---------------------|------------------|--------------------|
| Bovis               | 2 (2,2%)         | 16 (1,2%)          |
| Cas/Delhi           | 6 (6,7%)         | 30 (2,3%)          |
| Est-Asiatic         | 11 (12,4%)       | 67 (5,0%)          |
| Euro-American       | 67 (75,3%)       | 1153 (86,8%)       |
| Indo-oceanic        | 2 (2,2%)         | 52 (3,9%)          |
| West-African I e II | 1 (1,1%)         | 10 (0,8%)          |
| <b>Totale</b>       | <b>89 (100%)</b> | <b>1328 (100%)</b> |

**Legenda:** MDR = multifarmaco resistenza

L'analisi univariata mostra che le famiglie individuate mediante spoligotyping rispecchiano la derivazione geografica dell'individuo e del ceppo di TB caratteristico di un particolare continente o nazione (Tabella 9).

**Tabella 9– Percentuali relative alle nazionalità di appartenenza dei soggetti dello studio suddivisi per lineages.**

| Lineages/Nazionalità | Africa | Asia  | Cina  | Est Europa | Europa | Sud-America | Totale |
|----------------------|--------|-------|-------|------------|--------|-------------|--------|
| Bovis                | 14,2%  | 7,1%  | 7,1%  |            | 71,4%  |             | 100%   |
| Cas/Delhi            | 44,1%  | 32,3% |       |            | 23,5   |             | 100%   |
| Est-Asian            | 8,9%   | 12,8% | 34,6% | 7,7%       | 12,8%  | 23,1%       | 100%   |
| Euro-American        | 10,6%  | 1,9%  | 0.1%  | 6,6%       | 64,3%  | 16,2%       | 100%   |
| Indo Oceanic         | 8,3%   | 75,0% |       |            | 16,6%  |             | 100%   |
| West-African I e II  | 90,0%  |       |       |            | 10,0%  |             | 100%   |

Inoltre all'analisi univariata (Tabella 10) la multifarmacoresistenza risulta associata ai *lineages* East-Asian ( $p<0,01$ ) e CAS-Dehli( $p<0,01$ ). Emergono, poi, correlazioni significative tra altre variabili comuni a più *lineages*, tra cui l'età < ai 40 anni (con i *lineages* Euro-American, West-African, East-Asian e CAS), alcuni fattori di rischio di tipo sociale (con i *lineages* Euro-American ed East-Asian), l'esposizione a rischio (con il *lineage* East-Asian ed Euro-American) e la multifarmacoresistenza (per il *lineage* East-Asian e CAS).

Vi sono invece correlazioni dirette e univoche con ulteriori variabili prese in esame per l'analisi con alcuni *lineage* specifici quali: il genere maschile (con il *lineage* Indo-Oceanic), la forma disseminata (con i *lineages* West-African) e linfonodale (con il *lineage* Indo-Oceanic), la forma polmonare o extrapolmonare (con il *lineage* Bovis), l'infezione da HIV e altre comorbidità (con il *lineage* Euro-American), l'esame microscopico positivo (con il *lineage* West-African e CAS) e gli episodi di ricorrenze (con il *lineage* Indo-Oceanic).

**Tabella 10 - Analisi UNIVARIATA in base all'appartenenza ai lineages di *M.tuberculosis* (1993-2009).**

|  | <b>EURO-AMERICAN</b><br><b>(n =1220 )</b> | <b>BOVIS</b><br><b>(n =18 )</b> | <b>WEST AFRICA</b><br><b>(n =11 )</b> | <b>INDO-OCEANIC</b><br><b>(n =54 )</b> | <b>East-ASIAN</b><br><b>BEIJING</b><br><b>(n =78)</b> | <b>CAS-Dehli</b><br><b>(n =36)</b> |
|--|---|---------------------------------|---------------------------------------|--|---|------------------------------------|
| Età <40 anni, n (%)                        | 484/949 (51,0%)*                          | 6/14 (42,9%)                    | 9/10 (90,0%)*                         | 29/44 (65,9%)                          | 61/78 (78,2%)*  | 23/30 (76,7%)*                     |
| Sesso maschile, n (%)                      | 733/1194 (61,4%)                          | 11/18 (61,1%)                   | 7/10 (70,0%)                          | 25/54 (46,3%)*                         | 51/78 (65,4%)   | 22/34 (64,7%)                      |
| <b>Origine</b>                             |   |                                 |                                       |  |   |                                    |
| Italia-Europa occidentale, n (%)           | 742/1154 (64,3%)*                         | 11/16 (68,8%)                   | 1/10 (10,0%)*                         | 8/48 (16,7%)*                          | 10/78 (12,8%)*  | 8/34 (23,5%)*                      |
| Est-Europa, n (%)                          | 72/1154 (6,2%)*                           | 0/16 (0,0%)                     | 0/10 (0,0%)                           | 0/48 (0,0%)                            | 6/78 (7,7%)   | 0/34 (0,0%)                        |
| Asia (non-Cina), n (%)                     | 23/1154 (1,9%)*                           | 1/16 (6,2%)                     | 0/10 (0,0%)                           | 36/48 (75,0%)*                         | 10/78 (12,8%)*  | 11/34 (32,3%)*                     |
| Cina, n (%)                                | 8/1154 (0,7%)*                            | 1/16 (6,2%)                     | 0/10 (0,0%)                           | 0/48 (0,0%)                            | 27/78 (34,6%)*  | 0/34 (0,0%)                        |
| Sud-America, n (%)                         | 187/1154 (16,2%)*                         | 1/16 (6,2%)                     | 0/10 (0,0%)                           | 0/48 (0,0%)*                           | 18/78 (23,1%)*  | 0/34 (0,0%)*                       |
| Africa, n (%)                              | 122/1154 (10,6%)*                         | 2/16 (12,5%)                    | 9/10 (90,0%)*                         | 4/48 (8,3%)                            | 7/78 (9,0%)   | 15/34 (44,1%)*                     |
| <b>Fattori di rischio</b>                  |   |                                 |                                       |  |   |                                    |
| Esposizione precedente, n (%)*             | 107/998 (10,7%)*                          | 0/16 (0,0%)                     | 2/10 (20,0%)                          | 2/46 (4,3%)                            | 2/75 (2,7%)*  | 2/28 (7,1%)                        |
| Fattori di rischio sociale, n (%) #        | 84/998 (8,4%)*                            | 1/16 (6,2%)                     | 0/10 (0,0%)                           | 2/46 (4,3%)                            | 0/75 (0,0%)*  | 1/28 (3,6%)                        |
| HIV, n (%)                                 | 129/1218 (10,6%)*                         | 1/18 (5,6%)                     | 2/11 (18,2%)                          | 2/53 (3,8%)                            | 8/78 (10,3%)  | 4/35 (11,4%)                       |
| Altre comorbidità, n (%)                   | 77/998 (7,7%)*                            | 2/16 (12,5%)                    | 0/10 (0,0%)                           | 1/46 (2,2%)                            | 2/75 (2,7%)   | 0/28 (0,0%)                        |
| <b>Coinvolgimento clinico</b>              |   |                                 |                                       |  |   |                                    |
| TB Polmonare, n (%)                        | 808/1029 (78,5%)                          | 7/16 (43,8%)*                   | 6/10 (60,0%)                          | 34/47 (72,3%)                          | 60/78 (76,9%)   | 22/31 (71,0%)                      |
| TB Extrapolmonare (non-linfonodale), n (%) | 142/1029 (13,8%)                          | 6/16 (37,5%)*                   | 1/10 (10,0%)                          | 9/47 (19,1%)                           | 10/78 (12,8%)   | 7/31 (22,6%)                       |
| TB Linfonodale, n (%)                      | 5/1029 (0,5%)                             | 0/16 (0,0%)                     | 0/10 (0,0%)                           | 1/47 (2,1%)*                           | 0/78 (0,0%)   | 0/31 (0,0%)                        |
| TB Disseminata, n (%)                      | 74/1029 (7,2%)                            | 3/16 (18,7%)                    | 3/10 (30,0%)*                         | 3/47 (6,4%)                            | 8/78 (10,3%)  | 2/31 (6,5%)                        |
| Esame microscopico positivo, n (%)         | 525/730 (71,9%)                           | 8/10 (80,0%)                    | 3/9 (33,3%)*                          | 23/33 (69,7%)                          | 51/69 (73,9%)   | 11/22 (50,0%)*                     |
| MDR, n (%)                                 | 67/1220 (5,5%)                            | 2/18 (11,1%)                    | 1/11 (9,1%)                           | 2/54 (3,7%)                            | 11/78 (14,1%)*  | 6/36 (16,7%)*                      |
| Ricorrenze, n (%)                          | 76/1108 (6,9%)                            | 3/17 (17,7%)                    | 1/10 (10,0%)                          | 0/47 (0,0%)*                           | 4/76 (5,3%)   | 2/31 (6,4%)                        |
| Esito avverso ( a 1 anno), n (%)           | 64/686 (9,3%)                             | 3/11 (27,3%)*                   | 1/7 (14,3%)                           | 1/31 (3,2%)                            | 4/58 (6,9%)   | 0/24 (0,0%)                        |

**Legenda:** \* indica la significatività statistica con valori di  $p < 0.05$ , MDR = multifarmaco resistenza, HIV = Virus Immunodeficienza Umana, TB = tubercolosi, # Alcolismo, uso di droghe, senza fissa dimora, carcere, \*contatto recente con casi di TB.

All'analisi multivariata si conferma che la TB MDR è associata in modo indipendente al *sub-lineage* Beijing, che caratterizza numericamente il *lineage* East-Asian (aOR 3,4; CI 95% 1,5-7,6), mentre esiste una correlazione inversa con il *lineage* Euro-American (aOR 0,5; CI 95% 0,3-0,7). Viene, inoltre, confermata un'associazione tra *lineage* e paese di provenienza per quasi tutti i *lineage*. In particolare tale legame è stato riscontrato per la famiglia West-African e il continente africano, per la famiglia Indo-Oceanic e il continente Asiatico e per il *lineage* East –Asian con la Cina. Il dato che caratterizza la famiglia Cas/Delhi ha un rischio di ugual misura per Africa e Asia, mentre al contrario il *lineage* Euro-American ha un'associazione negativa con le provenienza da Africa, Asia ed Est Europa (Tabella 11).

**Tabella 11 – Valori di OR relativi alla nazionalità e *lineages* genotipici.**

|                     | Africa                  | Asia                      | Cina                     | Est Europa           | Europa               | Sud-America         |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Bovis               | -                       | -                         | -                        | -                    | -                    | -                   |
| Cas/Delhi           | <b>16,2 (4,3-60,6)</b>  | <b>19,8 (4,6-84,2)</b>    | -                        | -                    | -                    | -                   |
| East-Asian          | -                       | -                         | <b>60,9 (24,2-153,2)</b> | -                    | <b>0,2 (0,1-0,5)</b> | -                   |
| Euro-American       | <b>0,5 (0,4-0,7)</b>    | <b>0,1 (0,1-0,2)</b>      | <b>0,1 (0,1-0,3)</b>     | <b>0,4 (0,3-0,6)</b> | <b>1,4 (1,2-1,6)</b> | <b>1,2(0,9-1,6)</b> |
| Indo-Oceanic        | -                       | <b>203,4 (58,0-712,0)</b> | -                        | -                    | -                    | -                   |
| West-African I e II | <b>51,2 (6,3-414,7)</b> | -                         | -                        | -                    | -                    | -                   |

Oltre alla provenienza geografica, altre variabili sono risultate associate in modo indipendente ad alcuni *lineages* in particolare: si conferma che il *lineage* Euro-American è risultato associato ad alcuni fattori di rischio sociale (aOR 1,8; CI 95% 1,1-2,8); il *lineage* Indo-Oceanic al sesso femminile (aOR 3,8; CI 95% 9,1-11,6).

Al contrario le ricorrenze di TB sono significativamente meno frequenti tra i ceppi del *lineage* Euro-American (aOR 0,6; CI 95% 0,4-0,9) e le forme di TB polmonare tra quelli del *lineage* Bovis (aOR 0,2; CI95% 0,06-0,7). Inoltre, è significativamente meno frequente l'esito positivo dell'esame microscopico tra i ceppi del *lineage* West Africa (aOR 0,2; CI95% 0,04-0,7) (Tabella 12).

**Tabella 12 - MULTIVARIATA *Lineage* dal 1993 al 2009.**

| <b><i>Lineages</i></b> | <b>Variabile</b>             | <b>OR (95% CI)</b> | <b>p-value</b>  |
|------------------------|------------------------------|--------------------|-----------------|
| <b>Euro-American</b>   | Fattori di rischio sociale # | 1,8 (1,1-2,8)      | <b>0,01</b>     |
|                        | Ricorrenze                   | 0,6 (0,4-0,9)      | <b>0,03</b>     |
|                        | MDR                          | 0,5 (0,3-0,7)      | <b>&lt;0,01</b> |
| <b>Bovis</b>           | TB Polmonare                 | 0,2 (0,06-0,7)     | 0,01            |
| <b>West-African</b>    | Esame microscopico positivo  | 0,2 (0,04-0,7)     | 0,01            |
| <b>Indo-Oceanic</b>    | Sesso maschile               | 0,3 (0,1-0,6)      | <0,01           |
| <b>East-Asian</b>      | MDR                          | 3,4 (1,5-7,6)      | <0,01           |

**Legenda:** OR = Odds Ratio, CI = Intervallo di Confidenza, p = probabilità statistica, # Alcolismo, uso di droghe, senza fissa dimora, carcere, MDR = multifarmaco resistenza

## **4.5 OBIETTIVO 5: Analisi dei profili di resistenza ai farmaci antitubercolare in episodi di TB ricorrente**

### **Popolazione**

L'analisi dei 4237 episodi di TB documentati nel nostro Database ha consentito di identificare 83 episodi che rientravano nella definizione di ricorrenza di TB. In base ai test di genotipizzazione è stato possibile differenziare le recidive dalle reinfezioni esogene di TB. Al primo gruppo appartenevano 64 pazienti (recidive), al secondo 19 pazienti (reinfezioni esogene).

### **Analisi dei dati**

In Tabella 13 sono stati rappresentati i dati di confronto tra i due gruppi sopracitati. Degli 83 soggetti identificati, la maggior parte erano maschi, con una età mediana di 41 anni (20-96) e italiani (48, 57,8%). Il tempo medio intercorso tra il primo episodio di TB diagnosticato e il suo relativo episodio di ricorrenza è risultato essere pari a 9 mesi.

All'analisi univariata i pazienti con una diagnosi di reinfezione esogena sono apparsi molto più di frequente di nazionalità straniera [12/19 (63.2%) vs. 23/64 (35.9%);  $p$ -value 0.04].

Un intervallo prolungato tra il primo episodio di TB e la sua ricorrenza è stato osservato più comunemente tra pazienti con un'esperienza di reinfezione esogena rispetto ad una recidiva [11/19 (57.9%) vs. 11/56 (19.6%);  $p$ -value <0.01].

Gli episodi di multifarmaco resistenza sono stati osservati maggiormente tra pazienti che hanno sviluppato un episodio di recidiva successivo al primo episodio rispetto a pazienti che hanno generato un episodio di reinfezione esogena [20/32 (62.5%) vs. 1/19 (5.3%);  $p$ -value 0.03] (Tabella 13).

**Tabella 13 - Dati clinici e demografici a confronto tra pazienti con recidiva e reinfezione esogena di TB.**

|  | Recidive<br>n= 64 | Reinfezioni<br>esogene<br>n= 19 | OR (IC 95%)*   | p-value      |
|--|-------------------|---------------------------------|----------------|--------------|
| Età > 40 anni, n (%)                             | 30/56 (54%)       | 8/17 (47%)                      | 0,8 (0,3-2,3)  | 0,6          |
| Sesso maschile, n (%)                            | 47/64 (73%)       | 14/19 (74%)                     | 1,0 (0,3-3,2)  | 0,9          |
| Infezione da HIV, n (%)                          | 9/64 (14%)        | 4/19 (21%)                      | 1,6 (0,4-6,0)  | 0,4          |
| Nazionalità straniera, n (%)                     | 23/64 (36%)       | 12/19 (63%)                     | 3,0 (1,1-8,8)  | <b>0,04</b>  |
| Fattori di rischio sociale per TB <sup>#</sup>   | 11/55 (20%)       | 2/16 (13%)                      | 0,6 (0,1-2,9)  | 0,5          |
| Tempo intercorso tra episodi<br>> 24 mesi, n (%) | 11/56 (20%)       | 11/19 (58%)                     | 5,6(1,8-17,3)  | <b>0,003</b> |
| Sensibilità <i>In vitro</i> (1° episodio)        |                   |                                 |                |              |
| - sensibile, n (%)                               | 29/62(47%)        | 15/19(79%)                      | 1              | -            |
| - resistente non MDR, n (%)                      | 13/62 (21%)       | 3/19 (16%)                      | 0,4 (0,1-1,8)  | 0,2          |
| - MDR, n (%)                                     | 20/62 (32%)       | 1/19 (5%)                       | 0,1 (0,01-0,8) | <b>0,03</b>  |
| TB Extrapolmonare, n (%)                         | 8/55 (15%)        | 5/17 (29%)                      | 2,4 (0,7-8,8)  | 0,2          |
| Scarsa aderenza al trattamento, n (%)            | 9/42 (21%)        | 3/18 (17%)                      | 0,7 (0,2-3,1)  | 0,7          |

**Legenda:** CI = Intervallo di Confidenza; HIV = Virus dell'Immunodeficienza umana; MDR = Multifarmaco Resistenza; TB = tubercolosi, OR = Odds Ratio. <sup>#</sup> Alcolismo, uso di droghe, senza fissa dimora, carcere, contatto recente con casi di TB.

È degno di nota il confronto tra il profilo di suscettibilità degli isolati non MDR durante il primo episodio con il corrispondente ceppo micobatterico isolato durante l'episodio di ricorrenza; osservando da vicino i due profili si è giunti ad un interessante risultato: un simile tasso di sviluppo di resistenza ai farmaci è stato evidenziato nel gruppo recidive e gruppo reinfezioni esogene [12/40 (30,0%) vs. 7/17 (41,2%); *p* 0,5] (Tabella 14).

Delle variabili cliniche/molecolari associate con gli episodi di reinfezioni esogene nell'analisi univariata (Tabella 13), l'analisi di regressione logistica ha dimostrato che le reinfezioni esogene sono associate con un tempo più prolungato tra i due episodi [aOR 7,4 (1,9-28,3); *p* 0,004] e ad una nazionalità straniera [aOR 2,3 (0,6-8,4); *p* 0,2], mentre le recidive di TB sono associate alla multifarmaco resistenza [aOR 0,1 (0,01-0,9); *p* 0,04] (Tabella 15).

**Tabella 14 – Analisi di sensibilità antimicrobica di ceppi di *M. tuberculosis* isolati durante il primo episodio di TB e nell’episodio di TB ricorrente.**

| <b>Gruppo recidiva</b><br><i>n = 64</i>            | <b>n</b> | <b>1 episodio</b>                           | <b>2 episodio</b>                               |
|--|----------|---|---|
|  | 20       | sensibile                                   | sensibile                                       |
|  | 8        | sensibile                                   | resistente non-MDR<br>(3 H, 2 R, 1 E, 1 S, 1 Z) |
|  | 1        | sensibile                                   | ND  |
|  | 7        | resistente non-MDR<br>(3 H, 2 S, 1 HS, 1 R) | non modificato                                  |
|  | 4        | resistente non-MDR<br>(2 HS, 1 S, 1 R)      | MDR   |
|  | 1        | resistente non-MDR (Z)                      | sensibile                                       |
|  | 1        | resistente Non-MDR (Z)                      | ND  |
|  | 20       | MDR   | MDR   |
|  | 1        | ND  | resistente non-MDR (H)                          |
|  | 1        | ND  | MDR   |
| <b>Gruppo reinfezione esogena</b><br><i>n = 19</i> | <b>n</b> | <b>1 episodio</b>                           | <b>2 episodio</b>                               |
|  | 9        | sensibile                                   | sensibile                                       |
|  | 2        | sensibile                                   | resistente non-MDR (1 E, 1 S)                   |
|  | 4        | sensibile                                   | MDR   |
|  | 1        | resistente non-MDR (H)                      | ND  |
|  | 1        | resistente non-MDR (H)                      | sensibile                                       |
|  | 1        | resistente non-MDR (HS)                     | MDR   |
|  | 1        | MDR   | MDR   |

**Legenda:** E = etambutolo; H = isoniazide; R = rifampicina; S = streptomina; Z = pirazinamide; ND= non disponibile; MDR= Multifarmaco Resistenza.

**Tabella 15. Analisi di regression logistica per valutare i fattori di rischio per le reinfezioni esogene di TB.**

|  | <b>aOR (CI 95%)*</b> | <b>p-value</b> |
|--|----------------------|----------------|
| Tempo intercorso tra gli episodi > 24 mesi | 7,4 (1,9-28,3)       | <b>0,004</b>   |
| Isolato MDR al primo episodio              | 0,1 (0,01-0,9)       | <b>0,04</b>    |

**Legenda:** aOR = Odds Ratio aggiustato; CI = Intervallo di Confidenza; HIV = Virus Immunodeficienza umana; MDR = Multifarmaco Resistenza.

## 5. *Discussione*

In Italia, in base ai dati dei pazienti sottoposti a notifica nel 2008 i tassi di incidenza della TB sono pari a 7,66 per 100.000 abitanti e nello stesso anno il 3,7% dei casi era provocato da TB multi resistente (Multi Drug Resistant Tuberculosis, MDR-TB) (31).

La farmaco-resistenza si sviluppa prevalentemente in seguito all'assunzione irregolare dei farmaci o all'impiego di trattamenti inadeguati. D'altra parte, il fattore più importante che ha portato alla crescita esponenziale dei casi di TB MDR e XDR sembra essere la trasmissione della resistenza in pazienti neo-infetti.

L'incremento di proporzioni di casi MDR è influenzato da una moltitudine di fattori che includono: l'effettiva variabilità e osservanza dei programmi di controllo e linee guida nazionali, la presenza variabile di comorbidità (coinfezione con HIV) tra i casi di TB incidente, differenti fattori legati all'ospite come la presenza dell'antigene II allele DQB1\*0503 dei leucociti umani (HLA) (123).

Nel nostro studio di popolazione ci siamo prefissati di fornire una visione d'insieme della problematica degli TB-MDR nell'hinterland milanese, con l'intento di approfondire il comportamento dei ceppi MDR in relazione ai fattori di rischio che ne favoriscono la diffusione, alla propensione a far parte di raggruppamenti di casi (*clustering*), all'appartenenza a *lineages* genotipici e al fenomeno delle ricorrenze della TB.

Nella realtà milanese, la maggior concentrazione dei casi di MDR-TB è stata osservata negli anni '90, in cui si è sviluppata una epidemia nosocomiale negli ospedali italiani che ha coinvolto maggiormente pazienti affetti da HIV (164-165). I fattori che contribuirono alla diffusione di TB MDR sono stati molteplici. Le strutture per l'isolamento respiratorio e le misure del controllo dell'infezione non furono adeguate all'entità del fenomeno. Inoltre la probabilità della trasmissione è stata quasi sicuramente potenziata dalle condizioni di sovraffollamento nei reparti di malattie infettive degli ospedali in questione, dalla scarsa aderenza alla terapia ai farmaci dei soggetti coinfecti TB/HIV (la maggior parte con conta di CD4+ molto bassa) che in quegli anni rappresentavano la maggior parte dei pazienti ospedalizzati. Per finire, vi fu del ritardo nel riconoscere la portata del fenomeno epidemico e la potenzialità di diffusione tra strutture ospedaliere.

Dai dati raccolti ed elaborati dall'Istituto Superiore di Sanità ed inviati dal Ministero all'ECDC, si evince che nel periodo 2004 – 2008 le percentuali di TBC farmaco-resistente in Italia erano abbastanza stabili fino al 2007 con valori che si sono attestati al 3,7% del totale dei ceppi analizzati (31).

L'Italia è considerata in letteratura un paese a basso tasso di incidenza per i casi di TB. I casi di MDR analizzati per il nostro studio per la maggior parte riguardavano pazienti di nazionalità italiana 216/322 (67,1%). Escluso il fenomeno di epidemia nosocomiale relativo ai primi anni del nostro studio (come descritto in precedenza) la persistenza di TB MDR nei successivi anni a carico degli Italiani è da spiegarsi con i forti flussi migratori di soggetti provenienti da zona ad alta incidenza di TB MDR come Cina, Nord Africa, Perù ed Est Europa.

Dall'analisi di regressione che metteva a confronto pazienti MDR e non-MDR, è emerso che la MDR è significativamente meno frequente tra i pazienti di origine italiana, mentre esiste un'associazione significativa con le forme polmonari di TB e con alcune patologie concomitanti. E' inoltre particolarmente frequente negli episodi di ricorrenza.

L'origine geografica dei pazienti con MDR-TB è un elemento di assoluta rilevanza epidemiologica.

La maggioranza dei casi di resistenza sono concentrati in alcune ben identificate aree geografiche o tra i pazienti provenienti da queste stesse aree che sono emigrati nei paesi occidentali (169).

La associazione tra paesi dell'Est Europa e forme MDR si spiega con differenti fattori quali: l'impovertimento delle popolazioni, la disoccupazione, le peggiorate condizioni di vita e i deficit nutrizionali, collegati anche all'abuso di alcool e di stupefacenti e al fumo, hanno favorito sia la trasmissione della infezione, sia la sua riattivazione ed evoluzione a malattia conclamata nei soggetti infettati.

Anche la criminalità ha determinato l'aumento della popolazione carceraria, facilitando la trasmissione nell'ambito penitenziario. In aggiunta, il declino dei servizi di base, con lunghe attese diagnostiche, non sostenute da strumenti e regimi adeguati, l'assenza di alcuni farmaci essenziali e misure deficitarie di controllo dell'infezione in ambiti nosocomiali ed extra-nosocomiali, hanno determinato sia fallimenti terapeutici che l'insorgenza e la trasmissione della farmaco-resistenza che si è mantenuta anche con l'arrivo in Italia (169).

L'Asia, come descritto dalla letteratura, è il continente con il maggior numero di casi di MDR TB: si stima che il 50% dei casi a livello mondiale si verifichi in Cina e in India, un tasso di significativamente elevato rispetto alla media globale. Tale diffusione potrebbe essere dovuta alle condizioni di sovraffollamento delle abitazioni e alle misure igienico-sanitarie carenti in ancora molte aree della Cina che favoriscono la trasmissione di TB per contatto tra gli abitanti. Durante un programma nazionale di sorveglianza in Cina nel 2007, il tasso di MDR stimato fra i nuovi casi di TB era 5.7%, ma ancor più elevato nei casi di pazienti pre-trattati (25.6%) (170).

Nel nostro studio invece non è stata evidenziata una particolare forte associazione tra la popolazione Cinese e le TB MDR anche se il dato in univariata si avvicina molto alla significatività statistica ( $p = 0,06$ ).

In particolare il genotipo Beijing, ad elevata virulenza, è largamente diffuso tra i ceppi MDR e per comprendere tale associazione, studi condotti in Cina per l'appunto, basati sul sequenziamento del genoma completo di *M. tuberculosis* Beijing hanno evidenziato nuove e specifiche mutazioni, deputate come responsabili della resistenza ai farmaci e virulenza di questi ceppi (171,172).

Per quanto riguarda la sede di localizzazione della TB, come da atteso, il sistema respiratorio (polmoni e pleura) è risultato quello in assoluto più colpito tra i casi presenti nella nostra analisi. L'associazione riscontrata tra casi di MDR e le forme polmonari di TB è probabilmente dovuta al fatto che le forme attive polmonari diffondono più facilmente il bacillo per via aerea e sono più facilmente in grado di generare epidemie vere e proprie. Anche uno studio condotto in India ha rilevato un tasso elevato di MDR tra le nuove tubercolosi polmonari risultate positive all'esame microscopico (173).

Tra i fattori di rischio per MDR-TB è emersa anche la possibile relazione con altre forme morbose, in particolare il diabete mellito. Questo dato è stato evidenziato anche da un recente studio in cui il diabete mellito veniva identificato nel 17% di 1407 pazienti con TB MDR ed era associato ad un maggior rischio di insuccesso terapeutico (174).

Un ulteriore fattore di rischio che è spesso associato alle forme di TB MDR è la coinfezione con HIV, come dimostrato in svariati studi effettuati in diverse zone geografiche (175,176).

Nel nostro caso, avendo depurato la casistica dei pazienti HIV positivi facenti parte dell'epidemia nosocomiale iniziale, la variabile coinfezione con HIV nei successivi anni non è risultata associata alle forme MDR, come dimostrato anche in altre ricerche scientifiche condotte in India e Iran (177,178,179).

E' opinione comune che il raggruppamento di casi di TB in *cluster* con identico pattern genotipico sia il risultato di una catena di trasmissione di un medesimo ceppo di *M.tuberculosis*. Viceversa, i ceppi sporadici sarebbero plausibilmente espressione di una riattivazione endogena, in quanto non correlabili ad una trasmissione recente della TB. Con l'avvento della metodica di RFLP è stato possibile dimostrare che la diffusione di casi di TB che si raggruppavano in *cluster*, era molto più comune di quanto immaginato (180-182). Queste conclusioni sono basate sull'assunzione che l'emivita dei pattern genotipici del micobatterio è breve. Se fosse più lunga, il fenomeno di *clustering* difficilmente potrebbe riflettere il concetto di trasmissione recente (183,184).

Il fenomeno del raggruppamento in cluster dei casi di *M. tuberculosis* è stato spesso associato alla nazionalità di appartenenza dei pazienti, come da studi in pazienti provenienti dai Paesi Baltici e da altre aree della Ex-URSS (185).

Il nostro studio non ha messo in evidenza questo aspetto, anche se, paradossalmente, è risultato che la provenienza da nazioni dell'Est Europa correlava con un minor rischio di appartenere a cluster di casi tra loro associati, come se questi pazienti fossero più facilmente soggetti a episodi di riattivazione endogena di TB. Viceversa, la positività all'esame microscopico positivo è associata all'appartenenza a cluster di casi di TB. Questa seconda variabile potrebbe riflettere una maggior propensione dei pazienti appartenenti a cluster di trasmissione recente di TB ad avere alte cariche microbiche e/o una persistenza di bacilli per lungo tempo nei materiali biologici (principalmente nell'espettorato), che favorisce la trasmissione della malattia, rispetto ai pazienti che risultano negativi all'esame microscopico. Anche uno studio di sorveglianza nazionale condotto una decina di anni fa negli Stati Uniti d'America ha evidenziato una associazione significativa della positività microscopico positivo e il raggruppamento degli isolati in *cluster* (186).

La nostra analisi multivariata non ha mostrato, invece che la TB MDR è un fattore di rischio associata al raggruppamento in *cluster*, nonostante l'analisi univariata mostrasse un trend ai limiti della significatività statistica. Ciò potrebbe essere dovuto come anticipato prima alla drastica riduzione numerica di casi di MDR (12/168 7,1%) successiva all'epidemia degli anni '90 tra pazienti HIV-positivi, con una conseguente riduzione anche del fenomeno di raggruppamento in *cluster*.

Anche l'associazione delle diverse forme di TB e della eventuale farmaco resistenza con particolari lineage genotipici è un tema molto discusso in letteratura.

Il *lineage Euro-American*, che è preponderante (54%) tra i nostri pazienti genotipizzati con *spoligotyping*, è diffuso nel territorio milanese tra soggetti di nazionalità europea e quindi italiana, non è associato alla resistenza ai farmaci antitubercolari, ma solamente a fattori di rischio di tipo sociale. Un lavoro simile al nostro condotto a San Francisco ha dimostrato che un particolare *sub-lineage* (ST 183 – X) del *lineage Euro-American* era associato all'incremento di casi di ricorrenze (dato non confermato nella nostra casistica) e alla condizione di senza-tetto (187).

Per il *lineage Beijing*, invece, oltre a esservi una forte associazione con la nazionalità cinese (188), è stata frequentemente dimostrata un'associazione con la multifarmacoresistenza. Anche i nostri risultati confermano questa relazione, in base alle frequenza di MDR tra i casi con TB da *lineage East-Asian*, che comprende la famiglia Beijing. Uno studio recente e molto dettagliato ha provato a dare una spiegazione di questa capacità del ceppo verso gli antitubercolari. La risposta è da ricercarsi in mutazioni a carico di geni del metabolismo dei lipidi e di riparazione del DNA, i quali sembrerebbero essere maggiormente coinvolti nel conferire a tale genotipo una aumentata trasmissione e resistenza ai farmaci (171,189).

Principalmente i ceppi che *clusterizzavano* sulla base dei nostri di genotipizzazione molecolare erano appartenenti ai *lineage Beijing* e T nella variante Tuscany. Queste osservazioni troverebbero una conferma in un lavoro condotto in Russia e nei paesi dell'Ex-Urss (190). I ceppi di *M. tuberculosis* nella popolazione della regione di Pskov (nel nord ovest della Russia), sono rappresentati principalmente da Beijing, LAM, Haarlem e T types, un dato che rispecchia i genotipi prevalenti in tutta la Russia e la relativa parte Europea. Dallo studio è emerso anche che il *lineage Beijing* è associato con un alto tasso di resistenza ai farmaci tra i nuovi casi di TB suggerendo quindi un impatto critico di tale famiglia genotipica sulla trasmissione dei TB-MDR in questa regione della Russia.

Per i rimanenti *lineage Bovis*, West Africa, Indo Oceanic e Cas/Delhi presi in esame, nella nostra analisi di regressione non è stata dimostrata una associazione significativa tra famiglia genotipica e multifarmacoresistenza.

In letteratura però vi sono alcuni studi che documentano che per il *lineage Bovis*, di per sé già resistente alla pirazinamide, se classificato anche MDR, ciò pone un rischio aggiuntivo nel trattamento farmacologico dei pazienti e anche per questa famiglia genotipica le ragioni sono da ricercarsi in sostituzioni nucleotidiche a carico dei geni per la resistenza ai farmaci come *rpoB*, *rpsL*, *embB*, and *gyrA* già ben descritti per il *M. tuberculosis* (191).

Anche per le famiglie Indo/Oceanic (EAI and MANU) e Cas/Delhi, relative alle aree che gravitano attorno all'India, si riscontrano rassegne scientifiche che documentano il loro legame con la multifarmacoresistenza seppur con una incidenza minore rispetto al *lineage Beijing*. Ad esempio il gruppo di ricerca di Stavrum *et al*

(192), ha dimostrato nelle sue analisi molecolari che le mutazioni che conferiscono resistenza a rifampicina e isoniazide sono molto più frequenti nei ceppi CAS1\_DELHI rispetto agli isolati non-CAS\_DELHI.

Al lineage CAS-Delhi appartiene, invece, il *cluster* più consistente nella nostra popolazione studio (*cluster* D) che è stato quello presente negli anni relativi all'epidemia nosocomiale documentata negli ospedali milanesi e trasmessosi anche nelle province limitrofe a Milano.

Nei paesi a bassa endemia tubercolare, come l'Italia, le ricorrenze di TB sono dovute soprattutto ad una recidiva dell'episodio precedente, nonostante siano possibili anche episodi di reinfezioni esogene (193).

Ricerche precedenti hanno sovrarappresentato o sottostimato la presenza dei ceppi MDR nelle popolazioni in studio (194), ciò ha reso difficile stimare la reale influenza delle multifarmaco resistenze nei casi di ricorrenze di TB. Tuttavia, il nostro studio ha documentato una associazione tra ceppi *M. tuberculosis* MDR e l'aumento del rischio di recidiva di TB, come evidenziato anche da altri autori (195).

Abbiamo anche osservato che le ricorrenze di TB erano caratterizzate da una maggior frequenza di MDR se confrontate con i ceppi isolati durante il primo episodio, che richiedevano regimi di farmaci anti-TB di seconda linea per un terzo dei pazienti osservati, senza differenze tra recidive e reinfezioni esogene.

Al contrario, la presentazione di un quadro clinico più severo durante il secondo episodio (o nuovi *foci* extra-polmonari o malattia disseminata) era significativamente più frequente nel contesto delle reinfezioni esogene.

L'analisi multivariata non ha mostrato alcuna associazione significativa tra le reinfezioni esogene e l'età superiore ai 40 anni, il sesso o la nazionalità di origine dal paziente. Quest'ultimo fattore è stato, invece, correlato in uno studio danese con un maggior rischio di reinfezione esogena. (196). Lo stesso studio e uno studio precedente (197) hanno dimostrato la correlazione tra la presenza di escavazioni polmonari e le recidive di TB, suggerendo una durata del trattamento prolungata in questa popolazione. I nostri dati non sono stati sufficienti per valutare tale associazione.

## ***Conclusioni***

Nell'ultimo decennio i tassi di incidenza di TB in Italia sono stabilmente inferiori ai 10 casi per 100.000 abitanti, inserendo il nostro paese tra quelli a bassa endemia. Analogamente stabili sono i tassi di multi farmaco resistenza, assestandosi intorno al 3% del totale delle TB.

Nonostante il quadro nazionale non desti particolare preoccupazione, sono emersi dallo studio alcuni aspetti che meritano particolare attenzione. Subito dopo l'epidemia nosocomiale di MDR-TB tra pazienti HIV-positivi degli anni Novanta, sono cresciuti i tassi di casi di MDR negli stranieri. Infatti, la popolazione immigrata è a maggior rischio di avere un'infezione da *M. tuberculosis* multi-resistente, anche se con frequenze diverse nelle diverse etnie. Le forme polmonari e le ricorrenze di TB (quando attribuite a una recidiva e non ad una reinfezione esogena) caratterizzano gli episodi di MDR TB.

Anche l'associazione del *lineage* Beijing (caratteristico per la sua documentata virulenza e farmacoresistenza e associazione in *cluster*) con soggetti provenienti dall'Asia e dall'Est Europa è un fattore preoccupante poiché l'emigrazione cinese nel Comune di Milano sta raggiungendo livelli molto elevati negli ultimi anni.

Il raggruppamento in *cluster* è invece risultato associato all'esame microscopico positivo (fonte principale di trasmissione aerea).

A fronte dei dati raccolti da questo studio possiamo concludere che le caratteristiche cliniche e molecolari associate ai casi di TB MDR possono essere per noi un riferimento e una guida per tenere sotto controllo il fenomeno delle MDR ed evitare una diffusione di ben maggior entità.

## 6. Bibliografia

1. Bacterial Patogenesis A Molecular Approach, Abigail A., Salyers and Dixie D. Whitt, Washington, 1994
2. Charlotte Roberts, The Palaeopathology of Tuberculosis, Università di Pisa, 2009.
3. Enciclopedia Treccani della Scienza e della Tecnica, L'origine delle malattie, 2007
4. Pearce-Duvel J (2006). *The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease*. Biol Rev Camb Philos Soc 81 (3): 369–82.
5. Zink A, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich A (2003). *Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping*. J Clin Microbiol 41 (1): 359–67.
6. Origin, Spread and Demography of the Mycobacterium tuberculosis Complex. 2008 PLoS Pathog 4(9)
7. Chiara Mancini. Malati di cuore nell'Antico Egitto -Una "piaga" nascosta nei meandri delle arterie.
8. Hippocrates, Aphorisms., 2006.
9. "South America: Prehistoric Findings". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 98 (Suppl.I) 2003.
10. Y. A. Al-Sharrah (2003), "The Arab Tradition of Medical Education and its Relationship with the European Tradition", *Prospects* 33 (4), Springer.
11. George Sarton, *Introduction to the History of Science*. Dr. A. Zahoor and Dr. Z. Haq (1997). Quotations From Famous Historians of Science, Cyberistan.
12. David W. Tschanz, MSPH, PhD (2003). "Arab Roots of European Medicine", *Heart Views* 4 (2).
13. Ole Daniel Enersen, *Léon Charles Albert Calmette* in «Who Named It?».
14. Trail R (1970). *Richard Morton (1637–1698)*. Med Hist 14 (2): 166–74
15. Müller's. Zur Pathogenie der Impetigines. Auszug aus einer brieflichen Mitteilung an den Herausgeber. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*. 1839, page 82
16. Kentucky: Mammoth Cave long on history. *CNN*. 27 febbraio 2004. Accessed 8 ottobre 2006.
17. Hirsh AE, Tsolaki AG, De Riemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(14):4871-6.

18. McCarthy OR (2001). *The key to the sanatoria*. J R Soc Med 94 (8): 413–7.
19. Nobel Foundation. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1905. 2006
20. Waddington K (2004). *To stamp out "so terrible a malady": bovine tuberculosis and tuberculin testing in Britain, 1890–1939*. Med Hist 48 (1): 29–48).
21. Medical Research Council (UK). MRC's contribution to Tuberculosis research.,2007
22. Rosenthal SR., *BCG vaccination against tuberculosis*, Boston, Litle, Brown & Co., 1957
23. Bonah C (2005). *The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921–1933*. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci 36 (4): 696–721
24. Comstock G (1994). *The International Tuberculosis Campaign: a pioneering venture in mass vaccination and research*. Clin Infect Dis 19 (3): 528–40
25. Wolfart W (1990). *Surgical treatment of tuberculosis and its modifications—collapse therapy and resection treatment and their present-day sequelae*. Offentl Gesundheitswes 52 (8–9): 506–11
26. Paolo W, Nosanchuk J (2004). *Tuberculosis in New York city: recent lessons and a look ahead*. Lancet Infect Dis 4 (5): 287–93
27. World Health Organization (WHO) - Frequently asked questions about TB and HIV. Retrieved October 2006.
28. Lalloo U, Naidoo R, Amaram A (2006). *Recent advances in the medical and surgical treatment of multi-drug resistant tuberculosis*. Curr Opin Pulm Med 12 (3): 179–85)
29. WHO REPORT 2011.
30. WHO REPORT 2012.
31. RAPPORTO La Tuberculosi in Italia Anno 2008.
32. Global tuberculosis control 2010. Geneva: World Health Organization, 2011
33. Jarzembowski JA, Young MB, Nontuberculous mycobacterial infections. Arch Pathol Lab Med. 2008 Aug;132(8):1333-41.
34. Innovazione tecnologica nella diagnostica delle infezioni occupazionali batteriche e fungine aerotrasmesse, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani”, Roma, 2009

35. Runyon Ernest H., *Reviews of Infectious Diseases*, Vol. 3, No. 5, International Conference on Atypical Mycobacteria (Sep. - Oct., 1981), pp. 819-821
36. Cavallo G. Compendio di microbiologia generale e medica. Edizioni libreria Cortina; 515-533.
37. Varshneya Singh, Shilpa Jamwal, Ritu Jain, Priyanka Verma, Rajesh Gokhale, and Kanury V.S. Rao. Mycobacterium tuberculosis-Driven Targeted Recalibration of Macrophage Lipid Homeostasis Promotes the Foamy Phenotype, Cell Host and Microbe
38. Beckman EM, Melin A, Behar SM, Sieling PA, Chatterjee D, Furlong ST, Matsumoto R, Rosat JP, Modlin RL, Porcelli SA. CD1 c restricts responses of mycobacteria-specific T cells-evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J Immunol* 1996; 157: 2795-2803.
39. Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* 2003; 83: 91-97
40. McNeil M. Targeted preclinical drug development for *Mycobacterium avium complex*: a biochemical approach. *Mycobacterium Avium Complex Infection*. Edited by Korvick JA, Benson CA. New York: Marcel Dekker Inc; 1996:263-263
41. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 29-63.
42. Goren MB, D'Arcy Hart P, Young MR, Armstrong JA, Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Jul;73(7):2510-4).
43. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology* 1997; 1: 579-588.
44. Wikipedia - Mycobacterial cell wall diagram.png
45. *Chem. Biol*, 2002, 9; 546-553
46. Runyon EH, Mycobacteria: an overview, *Rev Infect Dis*. 1981;3(5):819-21.
47. La Placa M. *Principi di microbiologia medica*. Società editrice Esculapio 2007; 247-257.
48. S. T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekle, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, *et al*. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544 1998

49. Fleischmann R, Alland D, Eisen J *et al.* Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 2002;184: 5479–5490
50. Maniloff J. The minimal cell genome: ‘On being the right size’. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 10004–10006.
51. Saint-Ruf C, Matic I. Environmental tuning of mutation rates. *Environ Microbiol* 2006;8: 193–199.
52. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer K *et al.* Restricted structure gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 9869–9874.
53. Wayne L, Sramek H. Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38: 2054–2058.
54. Arber W. Elements for a theory of molecular evolution. *Gene* 2003;317: 3–11.
55. Arnold C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin Microbiol Infect.*;13(2):120-8, 2007.
56. Devulder G, Perouse de Montclos M, Flandrois J. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005;55: 293–302.
57. Adekambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54: 2095–2105.
58. Cole S. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett* 1999;452: 7–10.
59. Brosch R, Gordon S, Marmiesse M *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 3684–3689.
60. Gutierrez M, Brisse S, Brosch R *et al.* Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2005;1: 55–61.
61. Filliol I, Motiwala A, Cavatore M *et al.* Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic

- accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J Bacteriol* 2006;188: 759–772.
62. Yamanaka K, Fang L, Inouye M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplications for stress adaptation. *Mol Microbiol* 1998;27: 247–255.
  63. Gutacker MM, Smoot J, Lux M, Migliaccio C *et al.* Genomewide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 2002;162: 1533–1543.
  64. Baker L, Brown T, Maiden M *et al.* Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis* 2004;10: 1568–1577
  65. Mokrousov I. Multiple *rpoB* mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and second-order selection. *Emerg Infect Dis* 2004;10: 1337–1338.
  66. Cole ST. Comparative mycobacterial genomics. *Curr Opin Microbiol* 1998;1: 567–571.
  67. Kazazian HH. Mobile elements. drivers of genome evolution. *Science* 2004;303: 1626–1632.
  68. Thierry D, Cave M, Eisenach K *et al.* IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 1990;18: 188.
  69. Cave M, Eisenach K, Templeton G *et al.* Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 262–266.
  70. Warren R, Richardson M, Sampson S *et al.* Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: phylogenetic reconstruction of clonal expansion. *Tuberculosis* 2001; 81: 291–302.
  71. Fomukong N, Beggs M, el Hajj H *et al.* Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. *Tuber Lung Dis* 1997;78: 109–116.
  72. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 36:762-71.
  73. Frothingham R, Meeker-O’Connell W. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 1998;144: 1189–1196.

74. Mazars E, Lesjean S, Banuls A *et al.* High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 1901–1906.
75. Ferdinand S, Valetudie G, Sola C *et al.* Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validate the clonal structure of spoligotyping-defined families. *Res Microbiol* 2004;155: 647–654.
76. Arnold C, Thorne N, Underwood A *et al.* Evolution of short sequence repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;256: 340–346.
77. Benson G, Dong L. Reconstructing the duplication history of a tandem repeat. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 1999; 44–53.
78. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J., Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35(4):907-14,1997
79. Brudey K, Driscoll J, Rigouts L *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006;6: 23.
80. Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miörner H. Usefulness of spoligotyping To discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol.*;37(8):2602-6, 1999
81. van Embden JDA, van Gorkom T, Kremer K *et al.* Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol* 2000;182: 2393–2401.
82. Banu S, Gordon SV, Palmer S *et al.* Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and prevalence of the Beijing strain. *J Clin Microbiol* 2004;42: 674–682.35.
83. Sun Y-J, Lee ASG, Ng ST *et al.* Characterisation of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy. *J Clin Microbiol* 2004;42: 5058–5064.
84. Levinson G, Gutman G. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1987;4: 203–221.

85. Fang Z, Morrison N, Watt B *et al.* IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Bacteriol* 1998;180: 2102–2109.
86. Kremer K, Au B, Yip P *et al.* Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 314–320.
87. Zink A, Sola C, Reischl U *et al.* Characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2003;41: 359–367.
88. Rothschild B, Martin L, Lev G *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Inf Dis* 2001;33: 305–311.
89. Wayne L.G., Good R.C., Krichevsky M.I. *et al.*, Third report of the cooperative, open-ended study of slowly growing mycobacteria by the International Working Group on Mycobacterial Taxonomy. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 39:267-278., 1989.
90. E.Tortoli, MD Cirilli, *Microbiologia Clinica*, Ed. 2008.
91. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. 2003. *Clin.Microbiol.Rev.* 16:319-354.
92. Adékambi T., Colson P., Drancourt M. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. 2003. *J.Clin.Microbiol.* 41:5699-5708.
93. Rogall T., Wolters J., Flohr T., Böttger E.C. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. 1990. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 40:323-330
94. Runyon E.H. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. 1970. *Am.J.Clin.Pathol.* 54:578-586
95. SIVITWEB=[http://www.pasteur-guadeloupe.fr80-81/SIVIT\\_ONLINE](http://www.pasteur-guadeloupe.fr80-81/SIVIT_ONLINE)
96. Anh DD, Borgdorff MW, Van LN *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 302-5.,

97. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, *et al.* Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1165-70.,
98. Zhang M, Gong J-H, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. *J Infect Dis*
99. Nicol MP, Sola C, February B, Rastogi N, Steyn L, Wilkinson RJ. Distribution of strain families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa., *J Clin Microbiol.* 2005 Nov; 43(11):5779-81.
100. Piersimoni C, Scarparo C, Cichero P, De Pezzo M, Covelli I, Gesu G, Nista D, Scagnelli M, Mandler F. Multicenter evaluation of the MB-Redox medium compared with radiometric BACTEC system, mycobacteria growth indicator tube (MGIT), and Löwenstein-Jensen medium for detection and recovery of acid-fast bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999 Aug;34(4):293-9.
101. El-Sadr WM, Tsiouris SJ., HIV-associated tuberculosis: diagnostic and treatment challenges. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008 Oct;29(5):525-31, 2008.
102. Wikipedia Principali sintomi della tubercolosi.
103. Nature Reviews, Immunology
104. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Immunologia cellulare e molecolare.* Edizioni Piccin, quarta edizione.
105. D.G. Russell. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology* 5, 39-47, 2007.
106. Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R *et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiology markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18
107. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3536-71.
108. Sola C, Filliol I, Legrand E, Rastogi N *et al.* Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. *Infection, Genetics and Evolution* 2003; 125-133.

109. Van Deutekom H, Supply P, Coutinho RA *et al.* Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Analysis, a More Accurate Method for Identifying Epidemiological Links between Patients with Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4473-4479.
110. Donoghue HD, Spigelman M *et al.* Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 584-92.
111. Scott AN, Menzies D, Behr MA *et al.* Sensitivities and Specificities of Spoligotyping and Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit–Variable-Number Tandem Repeat Typing Methods for Studying Molecular Epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 89-94).
112. Gopaul KK, Brown TJ, Gibson AL *et al.* Progression Toward an Improved DNA Amplification-Based Typing Technique in the Study of *Mycobacterium tuberculosis* Epidemiology. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2492-2498.
113. Wikipedia - Iniezione intradermica di PPD per la dimostrazione della reazione di Mantoux.
114. Moroni M, Esposito R, De Lalla F. *Malattie infettive*. Masson 2003; 429-438.
115. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Supply P *et al.* Assessment of an Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive- Unit–Variable-Number Tandem-Repeat Typing System Combined with Spoligotyping for Population-Based Molecular Epidemiology Studies of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 691-697.
116. Hanekom M, Victor TC, Warren RM *et al.* Discordance between Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit–Variable- Number Tandem-Repeat Typing and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Genotyping for Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Strains in a Setting of High Incidence of Tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3338-3345.
117. Wikipedia - Various pharmaceutical tuberculosis treatments and their actions
118. Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer SC, *et al.* Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. *Lancet* 2000;356: 1066-71.

119. Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D.A., Young D.B., and Shaw R.J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Spoligotyping and IS 6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 647-651.
120. Alessandra Bandera, Andrea Gori, Lidia Catozzi *et al.* Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *JCM*, Giugno 2001, p.2213-2218.
121. Tazi L, Kreiswirth B, Carriere C, Tibayrenc M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and its relevance to the surveillance and control of TB: an e-debate. *Infection, Genetics and Evolution* 2002; 153-158.
122. Prodinger WM. Molecular epidemiology of tuberculosis: toy or tool? A review of the literature and examples from Central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 2007; 119: 80-89.
123. Borna Müller, Sonia Borrell, Graham Rose, Sebastien Gagneux, The heterogeneous evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Volume 29, Issue 3, 2013, Pages 160–169, Trends in Genetics
124. Freiden TR, Streling TR, Munsiff SS *et al.* Tuberculosis. *Lancet* 2003; 362: 887-899.
125. Harries AD, Dye C. Tuberculosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2006; 100: 415-431.
126. Donald PR, Schoeman JF. Tuberculous meningitis. *N Engl J Med* 2004; 315: 1719-1720.
127. Verver S., Warren R. M., Beyers N. *et al.* Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 1430-1435, 2005.
128. van Rie A., Warren R., Richardson M. Exogenous Reinfection as a Cause of Recurrent Tuberculosis after Curative Treatment, *N. Engl J. Med.* 341, 1174-1179, 1999.
129. Panjabi R., Comstock G.W., Golub J.E. Recurrent tuberculosis and its risk factors: adequately treated patients are still at high risk. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 11(8), 828-837, 2007.
130. Dias H. M, Falzon D., Fitzpatrick C. *et al*, Global Tuberculosis Control. WHO 2012, WF 300
131. Tuberculosis Surveillance and Monitoring in Europe. Report Anno 2012, ISSN 1977-3986

132. Das S., Chan S.L., Allen B.W., Mitchison D.A., Lowrie D.B. Application of DNA fingerprinting with IS986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis patients in Hong Kong before, during and after short-course chemotherapy. *Tuberc. Lung Dis.* 74(1), 4751, 1993.
133. Verver S., Warren R.M., Munch Z. *et al.* Proportion of tuberculosis transmission that takes place in households in a high-incidence area. *Lancet* 17, 363(9404), 212-214, 2004.
134. Sonnenberg P, Murray J, Glynn JR, Shearer S, Kambashi B, Godfrey-Faussett P. HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. *Lancet* 2001; 358:1687–1693
135. Shen G., Xue Z., Shen X. *et al.* Recurrent Tuberculosis and Exogenous Reinfection Shanghai, China. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1777-1778, 2006.
136. Lambert M. L., Hasker E., Van Deun A., Roberfroid D., Boelaert M., Van der Stuyft P. Recurrence in tuberculosis: relapse or reinfection? *Lancet Infect. Dis.* 3,282-287, 2003
137. Narayanan S., Swaminathan S., Supply P. *et al.* Impact of HIV infection on the recurrence of tuberculosis in South India. *J. Infect. Dis.* 201, 691-703, 2010.
138. Chiang CY, Riley LW. Exogenous reinfection in tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:629-636, Wang JY, Lee LN, Lai HC, Hsu HL, Liaw YS, Hsueh PR, *et al.* Prediction of the tuberculosis reinfection proportion from the local incidence. *J Infect Dis* 2007; 196 (Suppl 2):281-8.
139. Warren R. M., Victor T. C., Streicher E. M *et al.* Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 610-614, 2004.
140. Martín A., Herranz M., Navarro Y. *et al.* Evaluation of the Inaccurate Assignment of Mixed Infections by Mycobacterium tuberculosis as Exogenous Reinfection and Analysis of the Potential Role of Bacterial Factors in Reinfection. *J. Clin. Microbiol.* 49(4),1331-1338,2011.
141. van Embden J. D., Cave M. D., Crawford J. T., *et al.* Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31(2), 406-409, 1993.

142. Ministero della Salute, AGGIORNAMENTO DELLE RACCOMANDAZIONI PER LE ATTIVITÀ DI CONTROLLO DELLA TUBERCOLOSI, "Gestione dei contatti e della tubercolosi in ambito assistenziale", Testo Integrale, Anno 2010
143. Crecimiento de *Mycobacterium Tuberculosis* en Löwenstein-Jensen <http://thales.cica.es>
144. Mazurek G.H., M.D. Cave, K.D. Eisenach, R.J. Wallace, J.H. Bates, J.T. Crawford. Chromosomal DNA Fingerprint Patterns Produced with IS6110 as Strain-Specific Markers for Epidemiologic Study of Tuberculosis. *J. Clin. Micro.* 1991 ; 2030-2033.
145. van Soolingen D., Hermans P.W.M., de Haas P.E.W., Soll D.R., van Embden J.D.A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 2578-86.
146. Maslow Joel N., Mulligan Maury E., and Arbeit Robert D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infect. Diseases*,1993;17:153-64.
147. Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D.A., Young D.B., and Shaw R.J. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Spoligotyping and IS 6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 647-651.
148. Peter F. Barnes and M. Donald Cave. Molecular Epidemiology of Tuberculosis. Review Article *N Engl J Med* 2003; 349:1149-1156
149. Prod'homme G, Guilhot C, Gutierrez MC, Varnerot A, Gicquel B, Vincent V. 1997. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J. Clin. Microbiol.*35:3331–3334.
150. Hawkey PM, Smith EG, Evans JT *et al.* Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* compared to IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis. *JCM* 2003; 41:3514-20.

151. Mathema B, Kurepina N, Bifani P, Kreiswirth B. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 658-685.
152. Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study, *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):1963-70.
153. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD., Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol.* 1993 Dec;10(5):1057-65.
154. Cirillo D., Miotto P Illustrazione schematica della tecnica di tipizzazione Spoligotyping, *Epidemiologia molecolare della tubercolosi.*
155. Warren RM, Streicher EM, Sampson SL, van der Spuy GD, Richardson M, Nguyen D, Behr MA, Victor TC, van Helden PD., Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data., *J Clin Microbiol.* 2002 Dec;40(12):4457-65).
156. Hill V, Zozio T, Sadikalay S, Viegas S, Streit E, Kallenius G, Rastogi N. MLVA based classification of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages for a robust phylogeographic snapshot of its worldwide molecular diversity. *PLoS One.* 7(9):e41991, 2012
157. Véronique Hill, Thierry Zozio, Syndia Sadikalay, Sofia Viegas, Elisabeth Streit, Gunilla Kallenius, Nalin Rastogi Research Article, MLVA Based Classification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Lineages for a Robust Phylogeographic Snapshot of Its Worldwide Molecular Diversity.*PlosOne*, 2012 Volume 7, (9) 1-16
158. SPOLIGOTYPING, A PCR-based method to simultaneously detect and type, *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria, Spoligotyping Kit Manual.
159. Heyderman RS, Goyal M, Roberts P, Ushewokunze S, Zizhou S, Marshall BG, Makombe R, Van Embden JD, Mason PR, Shaw RJ, Thorax., Pulmonary tuberculosis in Harare, Zimbabwe: analysis by spoligotyping, *53(5):346-50*, 1998.

160. S. Presciuttini, Alberi filogenetici, Genetica delle popolazioni, Pisa, Anno Accademico 2011-2012
161. Gagneux S, Small PM, Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development, *Lancet Infect Dis.*;7(5):328-37, 2007
162. David S, Ribeiro DR, Antunes A, Portugal C, Sancho L, de Sousa JG Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal.,*Infect Genet Evol.* 2007 Sep;7(5):609-17., 2007
163. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen, D. MIRU-VNTR<sup>plus</sup>: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Res* 2010, 38 Suppl:W326-331
164. Moro, Maria Luisa; Gori, Andrea; Errante, Isabella; Infuso, Andrea; Franzetti, Fabio; Sodano, Luisa; Iemoli, Enrico; The Italian Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak Study Group An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis involving HIV-infected patients of two hospitals in Milan, Italy, *AIDS*. 1998;12(9):1095-102
165. F. Franzetti, A. Gori, E. Iemoli, P. Meraviglia, F. Mainini, T. Quirino, A. degli Espositi, M. degli Innocenti, A. Grassini, G. Nardi and A. Cargnel. Outcome of Multidrug-Resistant Tuberculosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *CID*, 1999)
166. Brudey K, Driscoll J, Rigouts L *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology.*BMC Microbiol* 2006;6: 23
167. Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miørner H. Usefulness of spoligotyping To discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol.*;37(8):2602-6, 1999
168. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J., Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 35(4):907-14, 1997

169. Mario Raviglione, Global Tuberculosis Programme, Organizzazione Mondiale della Sanità, Ginevra, Svizzera, 2011
170. Qiao Liu, Limei Zhu, Yan Shao, Honghuan Song, Guoli Li, Yang Zhou, Jinyan Shi, Chongqiao Zhong, Cheng Chen, and Wei Luc, Rates and risk factors for drug resistance tuberculosis in Northeastern China, *BMC Public Health*. 2013; 13: 1171
171. Wu W, Zheng H, Zhang L, Wen Z, Zhang S, Pei H, Yu G, Zhu Y, Cui Z, Hu Z, Wang H, Li Y. A genome-wide analysis of multidrug-resistant and extensively drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Mol Genet Genomics*. 2013;288(9):425-36.
172. Yu XL, Wen ZL, Chen GZ, Li R, Ding BB, Yao YF, Li Y, Wu H, Guo XK, Wang HH, Zhang SL. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from South-central in China. *J Antibiot (Tokyo)*. 2013
173. Gupta H, Kant S, Jain A, Natu SM, Ahluwalia S. Initial drug resistance pattern among pulmonary tuberculosis patients. *Indian J Tuberc*. 2013;60(3):154-61
174. Kang Y.A. Kim S.Y. Jo K.-W. Kim H.J. Park S.-K. Kim T.-H. Kim E.K. Lee K.M. Lee S.S. Park J.S. Koh W.-J. Kim D.Y. Shim T.S., Impact of Diabetes on Treatment Outcomes and Long-Term Survival in Multidrug-Resistant Tuberculosis, *Respiration*, 2013
175. Joh JS, Hong HC, Jeong IA, Chin BS, Yang HJ, Choi H, Bang JH Proportion of multidrug-resistant tuberculosis in human immunodeficiency virus/*mycobacterium tuberculosis* co-infected patients in Korea. *J Korean Med Sci*. 2012;27(10):1143-6
176. Gandhi NR, Andrews JR, Brust JC, Montreuil R, Weissman D, Heo M, Moll AP, Friedland GH, Shah NS. Risk factors for mortality among MDR- and XDR-TB patients in a high HIV prevalence setting. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012 Jan;16(1):90-7
177. Pereira M, Tripathy S, Inamdar V, Ramesh K, Bhavsar M, Date A, Iyyer R, Acchammachary A, Mehendale S, Risbud A. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India. *Indian J Med Res*. 2005 Apr; 121(4):235-9

178. Aliasghar Farazi, Masoomeh Sofian, Nader Zarrinfar, Fatemeh Katebi, Seyed Davood Hoseini, and Roohollah Keshavarz. Drug resistance pattern and associated risk factors of tuberculosis patients in the central province of Iran. *Caspian J Intern Med*. 2013; 4(4): 785–789
179. Yanina Balabanova, Birute Radiulyte, Edita Davidaviciene, Richard Hooper, Olga Ignatyeva, Vladyslav Nikolayevskyy, and Francis A Drobniowski, Survival of drug resistant tuberculosis patients in Lithuania: retrospective national cohort study *BMJ Open*. 2011; 1(2): e000351
180. Small PM, van Embden JDA, Molecular epidemiology of tuberculosis. In: Bloom B, editor. *Tuberculosis pathogenesis, protection, and control*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1994. p. 569-82
181. van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001;249:1-26
182. Helden PD. Molecular epidemiology of TB: challenging dogmas and asking new questions. *IUBMB Life* 2002;53:219-23
183. de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis* 1999;180:1238-44
184. Yeh RW, Ponce dL, Agasino CB, *et al*. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis* 1998;177:1107-11
185. Isabelle Devaux, Kristin Kremer, Herre Heersma, and Dick Van Soolingen. Clusters of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Cases, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2009 July; 15(7): 1052–1060
186. Barbara A. Ellis, Jack T. Crawford, Christopher R. Braden, Scott J. N. McNabb, Marisa Moore, Steve Kammerer, and the National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network Work Group corresponding author. Molecular Epidemiology of Tuberculosis in a Sentinel Surveillance Population. *Emerg Infect Dis*. 2002 November; 8(11): 1197–1209

187. J. Anderson, L. G. Jarlsberg, J. Grindsdale, D. Osmond, M. Kawamura, P. C. Hopewell, M. Kato-Maeda. Sublineages of lineage 4 (Euro-American) *Mycobacterium tuberculosis* differ in genotypic clustering, *INT J TUBERC LUNG DIS* 17(7):885–891 2013
188. Chen Q, Pang Y, Liang Q, Lin S, Wang Y, Lin J, Zhao Y, Wei S, Zheng J, Zheng S. Molecular characteristics of MDR *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Fujian, China. *Tuberculosis* (Edinb). 2013
189. Liu BB, Lu LP, Lü B, Wan KL, Yan Y. Meta analysis on the correlation between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family strains and drug resistance. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2012;46(2):158-64.
190. Igor Mokrousov, Anna Vyazovaya, Tatiana Otten, Viacheslav Zhuravlev, Elena Pavlova, Larisa Tarashkevich<sup>4</sup>, Valery Krishevich<sup>4</sup>, Boris Vishnevsky, Olga Narvskaya, *Mycobacterium tuberculosis* Population in Northwestern Russia: An Update from Russian-EU/Latvian Border Region, *PlosOne*, Vol.7, Issue 7, e41318
191. Romero B, Aranaz A, Bezos J, Alvarez J, de Juan L, Mateos A, Gómez-Mampaso E, Domínguez L. Single-nucleotide polymorphism in two representative multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates collected from patients in a Spanish hospital harboring a human infection outbreak. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):826-7
192. Stavrum R, Myneedu VP, Arora VK, Ahmed N, Grewal HM. In-depth molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* from New Delhi--predominance of drug resistant isolates of the 'modern' (TbD1) type. *PLoS One*. 2009;4(2)
193. Giehl C, Lange C, Duarte R, Bothamley G, Gerlach C, Cirillo DM, Wagner D, Kampmann B, Goletti D, Juers T, Sester MTBNET - Collaborative research on tuberculosis in Europe. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2012
194. Lambert ML, Hasker E, Van Duen A, Roberfroid D, Boelaert M, Van der Stuyft P. Recurrence in tuberculosis: relapse or reinfection. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:282–287

195. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, Afonso O, Martin C, *et al.* Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 717-720).
196. Bang D, Andersen AB, Thomsen VO, Lillebaek T. Recurrent tuberculosis in Denmark: relapse vs reinfection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14(Suppl 4):447-453.
197. Sonnenberg JP, Shearer SC, Godfrey-Faussett P. Human immunodeficiency virus and the outcome of treatment for new and recurrent pulmonary tuberculosis in African patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:733-740.

## **6. Ringraziamenti**

*A tutti coloro che hanno seguito il mio percorso di dottorato in questi tre anni e hanno fatto crescere in me stessa la consapevolezza che ogni risultato ottenuto, seppur piccolo, sia un patrimonio prezioso per la ricerca scientifica.*