

# Riattivazione di focolai tubercolari: l'esperienza dell'Istituto Cantonale di Microbiologia

**R. Peduzzi, F. Baggi, F. Quadri**

\*Direttore Istituto Cantonale di Microbiologia Bellinzona

\*\*Responsabile Centro Nazionale Svizzero per i micobatteri,  
 Dipartimento di microbiologia medica, Università di Zurigo

\*\*\*Direttore Servizio di Pneumologia,  
 Ospedale Regionale di Bellinzona e Valli

## Introduzione

Il reparto di tubercolosi dell'Istituto Cantonale di Microbiologia (ICM) si occupa della diagnosi della tubercolosi e di altre micobatteriosi documentando ed effettuando una sorveglianza epidemiologica della malattia nel Cantone Ticino. Negli ultimi 27 anni, dal 1978 al 2004, fra i 77'326 campioni clinici messi in coltura per la ricerca di micobatteri sono stati isolati 1'206 stiptipi di primo isolamento. Malgrado la diminuzione constatata della malattia nella seconda metà del 20° secolo in tutti i paesi europei, la tubercolosi resta una malattia necessita una sorveglianza continua a causa dei movimenti migratori da paesi di forte endemia e del rischio di farmacoresistenza. Inoltre l'aumento di persone con un sistema immunitario indebolito (virus HIV, trapianti, ecc.) hanno dato una nuova importanza alle micobatteriosi atipiche considerate fino al 1980 poco rilevanti da punto di vista clinico. Le infezioni del complesso dei micobatteri tubercolari, che comprende *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (ceppo utilizzato per il vaccino), *M. africanum*, *M. microti* e *M. canettii*, sono soggette a dichiarazione obbligatoria in tutti i paesi. Si dispone dunque di statistiche affidabili che permettono di comparare la situazione della malattia fra i diversi paesi, periodi di tempo, incidenza e gruppi di persone affette dalla malattia.

Grazie alle tecniche molecolari per la tipizzazione è inoltre possibile effettuare indagini epidemiologiche per identificare i ceppi diffusi, distinguere fra reinfezione e nuova infezione e chiarire le relazioni esistenti nel caso di ripetute infezioni a livello comunitario o ospedaliero. In questo quadro risulta quindi interessante verificare le riattivazioni di focolai tubercolari mediante l'analisi dei dati registrati all'ICM.

## **Materiali e metodi**

I dati sono stati raccolti in maniera prospettiva ed analizzati con Epiinfo 6. Le informazioni concernenti il paziente provengono dal nostro formulario di richiesta di analisi e in alcuni casi dal medico curante.

### **Metodi di tipizzazione molecolare**

Spoligotyping: il metodo dello Spoligotyping (dall'inglese "spacer oligotyping") si basa sul poliformismo della regione genetica "Direct repeat" (DR) presente in tutti i ceppi di micobatteri del complesso tubercolare (MTBC). Questa regione genetica contiene ripetizioni multiple di 36 coppie di basi intercalate da sequenze non ripetitive, cosiddette "spacers", della lunghezza variabile fra le 34 e le 41 coppie di basi. Siccome ceppi diversi di MTBC differiscono per la presenza/assenza di questi "spacers", e questa caratteristica risulta essere molto stabile, i ceppi di MTBC possono essere differenziati e caratterizzati in base al cosiddetto profilo di spoligotyping. La tecnica si basa sull'amplificazione genetica della regione DR e seguente ibridazione dei prodotti su una membrana contenente un set di 43 "spacers" identificati nel ceppo di *M. tuberculosis* H37RvDR e nel ceppo di *M. bovis* BCG Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): la tecnica RFLP utilizza l'elemento mobile IS6110 ed è considerata il "golden standard" per la tipizzazione dei ceppi di *M. tuberculosis*. Ceppi diversi di MTBC sono caratterizzati sia da un numero diverso di questi elementi genetici presenti nel genoma che per la loro localizzazione a livello del DNA cromosomale. Il protocollo standard prevede la coltura dei ceppi per 3-4 settimane in quanto è necessaria una grossa quantità di biomassa per poter effettuare la tipizzazione. Il DNA genomico estratto viene frammentato mediante enzimi di restrizione appositi, fissato su una membrana e ibridizzato con una sonda specifica per l'IS6110.

### **Riattivazione di tubercolosi da *M. bovis***

Con riferimento alla riattivazioni di tubercolosi da *M. bovis* ci sembra interessante presentare di seguito nella tabella 1 i dati concernenti le 14 infezioni da *M. bovis* evidenziate presso l'ICM.

Va rilevato che l'agente della tubercolosi bovina può contaminare l'uomo soprattutto tramite l'ingestione di latte crudo di mucca. È risaputo che *M. bovis* è altrettanto patogeno per l'uomo che *M. tuberculosis*. Se si considera che nel secondo dopoguerra il risanamento delle bovine mediante l'abbattimento degli animali infetti e la pastorizzazione dei prodotti lattie-

**Tab. 1 - Profilo dei pazienti infettati da *Mycobacterium bovis* con il relativo materiale clinico dove è stato evidenziato il ceppo1)**

Data della diagnosi	Sesso	Età	Anno di nascita	Origine	Materiale	Progressa TBC
1982	F	70	1912	Ticino	espettorato	?
1983	M	45	1938	Ticino	espettorato	sì
1983	F	60	1923	Ticino	succo gastrico	no
1983	M	74	1909	Svizzera	espettorato	sì
1984	M	59	1925	Svizzera	espettorato	sì
1985	F	63	1922	Ticino	urina	no
1987	F	61	1926	Ticino	raschiam. uterino	sì
1988	M	69	1919	Ticino	broncoaspirato	sì
1989	F	69	1920	Ticino	linfonodo	?
1989	M	80	1909	Ticino	punt. pleurico	no
1990	M	51	1939	Ticino	urina	no
1990	F	83	1907	Svizzera	broncoaspirato	no
1991	M	90	1901	Ticino	espettorato	?
1992	F	52	1940	Germania	espettorato	No
1998	M	30	1968	Spagna	espettorato	No

Dall'età dei pazienti al momento della diagnosi risulta evidente che si tratta della riattivazione di focolai risalenti ad un periodo dove non era ancora avvenuto il risanamento della bovine (anni 1946-1948)

ri hanno considerevolmente ridotto il rischio di contagio, risulta interessante verificare l'origine e la classe d'età di questi casi. Potrebbe infatti trattarsi di una riattivazione di vecchi focolai dovuta ad un'esposizione antecedente al 1946-48 quando il risanamento degli animali non era ancora avvenuto, oppure casi importanti. Il fatto che questo tipo di tubercolosi si sia verificato quasi solo tra gli indigeni in età avanzata (mediana dell'età a 66 anni, contro i 51 anni per *M. tuberculosis*) ci porta a propendere per la prima delle due ipotesi. L'ultima infezione da *M. bovis* constatata nel 1998, la frequenza annuale massima è stata di 3 casi nel 1983 (tabella 1). -Su 15 pazienti, 13 erano indigeni (CH) d'età compresa tra i 45 anni e i 90 anni, un paziente proveniva dalla Germania ed il più giovane dalla Spagna (paziente di 30 anni).

### **Riattivazione di tubercolosi polmonare da *M. tuberculosis*: il caso.**

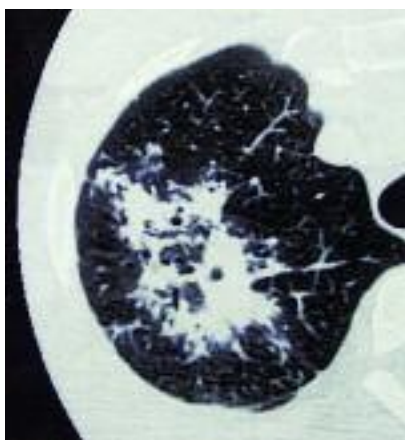
Un cittadino svizzero, fumatore di 53 anni lamentava stanchezza senza presentare febbre, tosse o sudorazione.

La radiografia effettuata dal medico curante risultò anormale (fig 1).



**Fig. 1 - Radiografia iniziale**

In assenza di tosse ed espettorazione venne effettuata una broncoscopia con lavaggio broncoalveolare (BAL) e biopsia polmonare transbronchiale. L'esame istologico rivelò un granuloma con caseificazione in assenza di bacilli alcool-acido resistenti (fig 3). Anche la colorazione di Ziehl-Neelsen effettuata sul BAL risultò negativa. Fu perciò posta la diagnosi di TB negativa all'esame microscopico e venne iniziata una terapia convenzionale a base di isoniazide, rifampicina, etambutolo e pirazinamide. L'esame colturale del BAL rivelò tuttavia la presenza di un ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente (MDR-TB) (tabella 2) e quindi la terapia antibiotica venne immediatamente



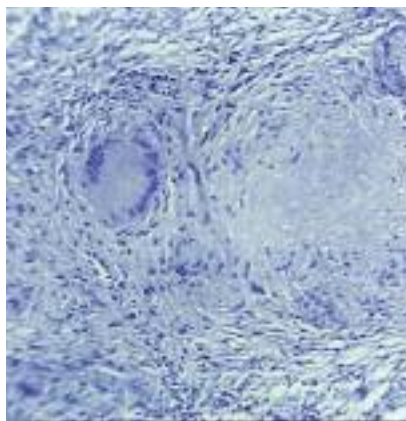
**Fig. 2 - TAC toracica, particolare**

venne eseguita una TAC toracica (fig 2), che confermò la presenza di alterazioni apicali dense, confluenti compatibili sia con lesioni tumorali o infettivo-infiammatorie.

Nell'anamnesi familiare risultò la morte del padre, 18 anni prima, forse di silicosi o silicotb.. Il paziente rammentava il controllo radiologico a tutti i membri della famiglia ma non di essere stato sottoposto ad una profilassi medicamentosa con farmaci specifici. L'esame clinico e l'esame di laboratorio (BRS, CRP, Hb, Lc, HIV negativo) risultarono normali.

modificata, (ciprofloxacina, pirazinamide ed etambutolo) portando ad un rapido miglioramento clinico e radiologico. Dopo la conversione negativa per una totale di 18 mesi con decorso normale sia clinico che radiografico.

Investigazione epidemiologica: la ricerca delle cartelle cliniche del padre presso l'ospedale dove morì e presso il medico curante era stata inizialmente infruttuosa. Infatti tutta la documentazione era stata nel frattempo eliminata. Tuttavia il responsabile del laboratorio ICM



**Fig. 3 - biopsia polmonare transbronchiale della lesione polmonare visibile sulla figura 4 (per gentile concessione dell'Istituto Cantonale di Patologia)**

si ricordava un caso di MDR-TB con lo stesso nome di famiglia e quindi negli archivi dell'istituto si ritrovarono i risultati microbiologici effettuati sul ceppo di *Mycobacterium tuberculosis* isolato dal campione di espettorato del padre.

Sorprendentemente il ceppo presentava lo stesso profilo di resistenza di quello isolato nel BAL del paziente attuale. Al Centro Nazionale di Referenza per i micobatteri, presso l'istituto di microbiologia medica dell'università di Zurigo, si ritrovò il ceppo del padre conservato a  $-70^{\circ}\text{C}$ . È stato quindi possibile procedere ad un'analisi

genetica comparativa mediante spoligotyping e RFLP (fig 4). che confermò la presenza di un profilo genetico identico dei due ceppi (quello isolato nel paziente attuale e quello del padre morto nel 1986). La diagnosi è stata perciò rivista in riattivazione tardiva (dopo 18 anni) di una infezione latente da *M. tuberculosis* multiresistente.

## Conclusioni

La dichiarazione obbligatoria a tutti i casi di tubercolosi, anche quelli senza conferma microbiologica (che per la Svizzera è del 17,5%) si basa sulle cale che a livello regionale, e l'utilizzo di indagini epidemiologiche mediante tecniche molecolari (spoligotyping e RFLP) permette di effettuare una sorveglianza continua di tubercolosi. Infatti più del 50% dei casi di tubercolosi concerne la popolazione straniera. Essa risulta fortemente influenzata dai flussi migratori, in particolare da paesi ad alta endemia, e risulta spesso difficile stabilire se si tratta di persone domiciliate, di passaggio o richiedenti l'asilo. Grazie alla standardizzazione dei protocolli per la tipizzazione dei ceppi isolati nei singoli laboratori (RFLP) è possibile effettuare una sorveglianza a livello globale dei ceppi in circolazione, si pensi in particolare ai ceppi di MTBC multiresistenti (MDR-TB). Inoltre queste tecniche permettono di differenziare a livello di singolo paziente fra reinfezione e nuova infezione e a livello epidemiologico l'identificazione di possibili focolai di tubercolosi. Una grossa limitazione della tecnica dell'RFLP consi-

## SPOLIGOTYPING



NZM 118/2003  
NZM 115/1986

*M. tuberculosis*  
*M. bovis*

## RFLP



NZM 118/2003  
NZM 115/1986

Marker  
Marker

NZM 118: MTBC del paziente

NZM 115: MTBC del padre del paziente 118

ste nella lentezza della fase iniziale di coltura dei ceppi, mentre lo spoligotyping offre il grande vantaggio di avvalersi di una fase iniziale di amplificazione che rende possibile effettuare questo tipo di analisi epidemiologica già a partire da campioni che contengono una piccola quantità di DNA genomico.

Per questa ragione il metodo dello spoligotyping è riconosciuto come metodo di prima scelta per la tipizzazione dei ceppi di *M. tuberculosis* visto che può contribuire ad una rapida identificazione di possibili relazioni di identità e quindi di trasmissione fra ceppi isolati in pazienti diversi. Visto il

**Tab. 2 - Profilo di resistenza del ceppo *Mycobacterium tuberculosis* isolato dai due pazienti (nel 1986 dal padre e a 18 anni di distanza dal figlio)**

<b>SENSIBILITÀ ALL'ANTIBIOTICO</b>	<b>CONCENTRAZIONE</b>
•Resistente a INH (Isoniacide)	0.1xx/ml
•Resistente a INH	1.0xx/ml
•Resistente a RMP	1.0xx/ml
•Resistente a RMP	10.0xx/ml
•Resistente a Streptomicina	
•Resistente a Rifabutina	
•Sensibile a EMB (Etambutolo)	
•Sensibile a PZA (Pirazinamide)	
•Sensibile a Ofloxacina	

limitato potere discriminante dello spoligotyping per i ceppi di *M. tuberculosis*, i risultati ottenuti dovrebbero essere in seguito verificati mediante metodi complementari quali l'RFLP.

Lo spoligotyping è invece considerato il "golden standard" per la tipizzazione dei ceppi di *M. bovis*.

Un bell'esempio di indagine epidemiologica è quello del paziente citato, dove una tubercolosi polmonare latente, contratta anni prima da un contatto con un familiare affetto da tubercolosi, può riattivarsi senza sintomi clinici particolari.

Risulta quindi fondamentale procedere ad un'accurata indagine per individuare le persone potenzialmente esposte al contagio, le quali dovrebbero essere controllate in modo continuo ed eventualmente sottoposte ad una corretta profilassi antibiotica, in particolare modo nel caso di una tubercolosi causata da un ceppo di *M. tuberculosis* farmacoresistente (MDR-TB). Infatti questo caso ha mostrato come questa possa manifestarsi in pazienti altrimenti in buona salute ed HIV negativi. Per quanto concerne i pazienti svizzeri affetti da tubercolosi bovina, risultano mediamente essere più anziani rispetto a quelli affetti da *M. tuberculosis* (mediana per l'età 66, rispettivamente 51) e l'ultimo caso diagnosticato risale a 5 anni fa. Questo lascia presupporre che si tratti di una riattivazione endogena di focolai dovuti al contatto con *M. bovis* prima del risanamento dei bovini nella seconda metà degli anni quaranta.

Per concludere, una documentazioe accurata dei singoli casi di tubercolosi, un'accurata indagine delle persone esposte al contagio, la valutazione su lunghi periodi di tempo dei casi registrati e l'impiego di tecniche molecolare per la tipizzazione contribuiscono ad un'efficiente sorveglianza della tubercolosi a livello locale, nazionale e internazionale.

## Bibliografia

- 1) Antoniskis D, Amin K, Barnes PF. (1990). Pleuritis as a manifestation of reactivation tuberculosis. *Am J Med.*; 89(4): 447-50.
- 2) Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L. *et al.* (2001) Global Trends in resistance to antituberculosis drugs. *N Engl J Med*, 344, 17: 1294-1303.
- 3) EuroTB. Surveillance of Tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 2001. <http://www.eurotb.org/>.
- 4) Lazzaro M, Cassis e gruppo di lavoro. (2002) Lotta alla tubercolosi nel Cantone del Ticino. Salute pubblica 2, (<http://www.ti.ch/med>).
- 5) Le Minor L et Véron M (1989) Bactériologie Médicale. Pari: éd. Flammarion.
- 6) Megan Murray and Edward Nardell. (2002). Molecular epidemiology

of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. Bulletin of the World health organisation; 80 (6).

7) Office fédéral de la santé publique. Elévation de l'âge médian de la tuberculose. Bulletin OSFP 2000, 7: 144-145.

8) Office fédéral de la santé publique. La tuberculose en Suisse en 1999 et 2000. Bulletin OSFP 2000, 9: 168-173.

9) Office fédéral de la santé publique. Résistance aux antituberculose en Suisse. *Bulletin OSFP* (2001), 13: 258-260.

10) Peduzzi R., Michelini V., Pagano E., (1998) Tubercolosi e micobatteriosi atipiche. *Tribuna medica*, 68: 5-14.

11) Peduzzi R., Michelini V., Pagano E., (2004) Infezioni da micobatteri dal punto di vista di un laboratorio di microbiologia.

*Tribuna medica*, 69: 269-275.

12) Pfyffer G E, Auckenthaler R, van Embden J D A, *et al.* (1998) *Mycobacterium canettii*, the Smooth Variant of *M. tuberculosis*, Isolated from a Swiss Patient Exposed in Africa. *Emerging Infectious Disease*. 4 (4): 631-4.

13) Pfyffer GE. (2003) Bacilles tuberculeux rares. *Bollettino dell'ufficio della Sanità Pubblica*, 28: 484-85.

14) Pfyffer GE. (2002) Epidémiologie moléculaire de la tuberculose. *Bollettino dell'ufficio della Sanità Pubblica*, 9: 175-76.

15) Quadri F, Baggi F, Peduzzi R., Michelini V., Zellweger J.P., (2004) Detection of late reactivation of multiresistant *tuberculosis by spoligotyping* and RFLP. *Swiss Medical Weekly*, 134:S8

16) Van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, *et al.* A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis complex*, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol*. 1997, 47(4): 1236-45.

17) Van Soolingen D, Van-der-Zanden AG, de-Haas PE, *et al.* (1998), Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using genetic markers. *J Clin Microbiol*. 36(7):1840-5.

18) Van Soolingen D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.*; 249: 1-26.

19) Vincent V et Rastoji N. (2000); Apport de la biologie moléculaire en mycobactériologie in: Feney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, eds. *Précis de Bactériologie Clinique*. Paris: ESKA, 1095-1106.

20) Wayne LG, Good RC, Böttger EC, *et al.* (1996). Semantide and chemotaxonomy-based analyses of some problematic phenotypic