

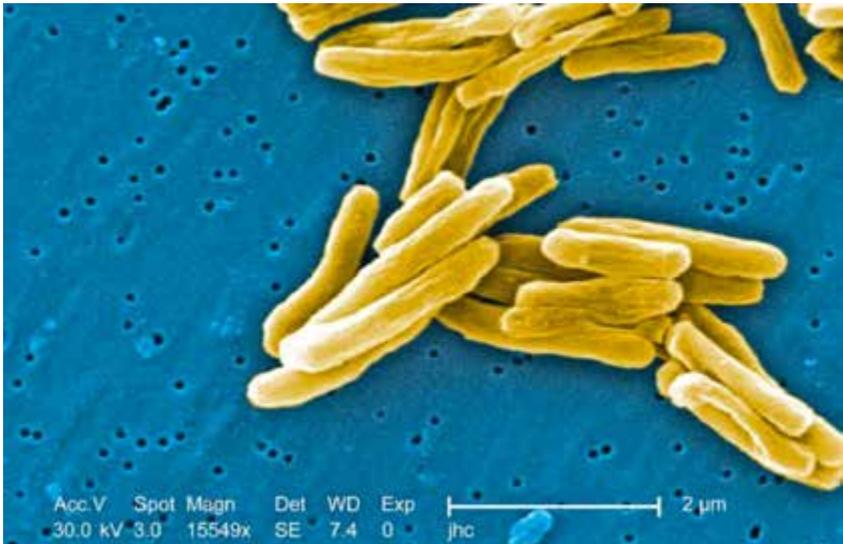
LA SUPER-TUBERCOLOSI E GLI ASPETTI INNOVATIVI NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO DEI MICOBATTERI

Raffaele Peduzzi, vice presidente Lega polmonare

Il 24 marzo 2013, in occasione della giornata mondiale indetta dall'OMS contro: l'HIV-AIDS, la malaria e la tubercolosi è stato aggiornato l'andamento delle tre malattie nel mondo. In particolare, per la tubercolosi sono registrati 8,7 milioni di nuovi casi ogni anno ed 1 milione e 400 mila pazienti muoiono annualmente di questa malattia. Inoltre, nello stesso bilancio dell'Organizzazione mondiale della salute (OMS) è stata messa in evidenza l'apparizione della super-tubercolosi in quanto le forme di tubercolosi resistenti ai trattamenti si diffondono.

Diversi elementi, legati all'andamento sanitario attuale, giustificano nuove indagini sui micobatteri anche dal profilo dell'analisi batteriologica al fine di meglio caratterizzarli a livello di specie e sotto-specie grazie all'utilizzo di mezzi analitici performanti.

Figura 1



Mycobacterium tuberculosis scansionata al microscopio elettronico. Immagine Center for disease control and prevention (CDC)

Infatti, attualmente bisogna far fronte a:

- l'apparizione della "super-tubercolosi" dovuta alla resistenza agli antibiotici
- un aumento della frequenza della circolazione di *M. bovis* anche a causa dei serbatoi negli animali selvatici; il ritorno della tubercolosi bovina
- una maggior frequenza nell'uomo di infezioni da micobatteri soprattutto negli immunodepressi a causa di interruzioni di terapie o di terapie incomplete. Aumento della frequenza da infezioni da MOTT.

Nel nostro modesto microcosmo la Lega polmonare ticinese e la Fondazione Dott. Pierluigi Crivelli hanno promosso e finanziato uno studio sui micobatteri condotto con una nuova tecnica analitica basata sulla spettrometria di massa. Ha beneficiato di questo credito e condotto l'indagine il biologo Nicholas Vecchietti, attualmente ricercatore negli USA. La ricerca si è svolta presso l'Istituto cantonale di microbiologia (ICM) di Bellinzona. Istituto che dalla sua istituzione svolge l'analisi batteriologica inerente la tubercolosi e da diversi anni traccia regolarmente delle sintesi sull'evoluzione delle malattie infettive polmonari sul nostro territorio in particolare con dei contributi annuali sul nostro Bollettino; segnatamente per la tubercolosi sono stati effettuati sei articoli di sintesi e in particolare nel 2007 è stata effettuata la valutazione statistica dei casi di tubercolosi registrati batteriologicamente in 30 anni alla direzione dell'ICM.

In Ticino, sulla base dei dati dell'Ufficio federale sanità pubblica nei 10 anni, dal 2003 al 2012, abbiamo una media di 19 casi (18,9) nuovi di tubercolosi ogni anno; negli ultimi 6 anni (dal 2007 al 2012) la media annuale di nuovi casi è di 19,3. Quindi registriamo un numero costante di nuovi casi annui.

Per quanto riguarda l'incidenza di casi, in Ticino nel 2012 per 100'000 abitanti è di 3.56, valore più basso nella comparazione con altri cantoni di confine come Ginevra 11.29 e Basilea città 12.35.

Resistenza dei micobatteri agli antibiotici

Nello stesso ordine di idee va segnalata l'apparizione di bacilli tubercolari molto resistenti agli antibiotici.

Definita anche "super-tubercolosi" in quanto si affacciano ceppi refrattari ad ogni tipo di cura, attualmente a disposizione dei medici curanti tanto che gli anglosassoni parlano di "Total drug resistance tuberculosis (TDR-TB)".

A questa problematica della resistenza la prestigiosa rivista "Time" del 4 marzo 2013 dedica la prima pagina (Fig. 2).

Figura 2

Nel titolo si evidenzia: “The drugs don’t work” (il medicamento non è efficace), spiegando “Il perché la tubercolosi resistente agli antibiotici è una minaccia per tutti noi”. (Mohr K., 2013)



Copertina del Time

Infatti, sempre secondo i dati dell'OMS le forme di resistenza agli antibiotici di prima linea sono a quota 630 mila e 50 mila sarebbero i casi di resistenza ancora più estesa, chiamata XDR-TB in quanto anche alcuni farmaci di seconda linea risultano inutili, siamo posti di fronte ad una graduatoria comprendente la MDR-TB (multi resistenza) la XDR-TB ("extensively" resistente) e la TDR-TB (resistenza totale).

Anche la rivista "Lancet" in occasione della giornata mondiale dedica una serie di articoli a questa problematica della super-tubercolosi. (Abubakar, I., 2013)

Inoltre, il quadro si complica in quanto dobbiamo considerare che gli espettorati di questi pazienti contengono i bacilli infettivi resistenti e di conseguenza rimangono contagiosi più a lungo in quanto sono casi più difficili da curare. Infatti il trattamento deve essere prolungato nel tempo.

Per queste ragioni i metodi recenti che permettono una diagnosi rapida e precisa a livello di specie di micobatteri risultano molto utili e si giustificano. Infatti, a livello di indagine parecchie sono ancora le "incertezze" sulla prevenzione e sul trattamento di queste forme di tubercolosi e questo ad oltre 100 anni dalla prima identificazione del bacillo causale da parte di Robert Koch.

A livello svizzero dal 1996 al 2009 per quanto riguarda la resistenza dei ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* agli antibiotici Isoniazide e Rifampicina abbiamo una situazione che può essere così riassunta: meno del 10% dei ceppi presenta una resistenza all'Isoniazide e meno del 2% ha una resistenza multipla (MDR) all'Isoniazide e alla Rifampicina. (Office fédéral de la santé publique, 2011). Situazione non allarmante ma da tenere sotto controllo.

Ritorno di *M. bovis*

In Europa si registra una recrudescenza nell'animale della tubercolosi bovina. La malattia nei bovini è stata segnalata in paesi finora considerati indenni come la Francia, la Germania, il Belgio, l'Austria e l'Olanda (Fig. 3).

Figura 3



In un comunicato dell'Ufficio veterinario federale del maggio 2010 si evidenziava "La tubercolosi bovina in Europa nuovi problemi per una malattia antica". Nelle nazioni vicine è stato segnalato il ritorno della tuberco-

losi bovina e recentemente, marzo 2013, anche in Svizzera sono stati segnalati dei casi di bovini infetti. All'inizio di aprile 2013 l'Ufficio federale di veterinaria (UFV) ha ordinato l'abbattimento completo di una mandria di mucche di un'azienda del Canton Friburgo in quanto era stato scoperto un caso di tubercolosi bovina. Riportiamo parzialmente il comunicato del 5.04.2013 dell'UFV.

“Gli accertamenti sistematici svolti in seguito sulla mandria hanno riscontrato un alto grado di contagio e datato la presenza della tubercolosi nell'azienda ad almeno tre anni fa. L'ufficio cantonale di veterinaria ha perciò ordinato di abbattere ed eliminare tutti gli animali della mandria infetta. Fino ad oggi non è stata riscontrata alcuna infezione di tubercolosi nelle persone che si sono occupate degli animali nelle aziende contaminate”.

Storicamente in Svizzera uno sforzo per il risanamento dei bovini è stato fatto nel 1946-48 (grazie ad un regolamento veterinario draconiano). Dall'inizio del secondo dopoguerra si reputava essere il nostro paese indenne dalla tubercolosi bovina.

Attualmente questo risanamento è in parte vanificato dal fatto che gli animali selvatici, in particolare i tassi ed i cinghiali, costituiscono dei serbatoi di *Mycobacterium bovis*. Questi animali si infettano cercando nutrimento anche nello sterco delle mucche. Inoltre, soprattutto il numero di cinghiali è in netta progressione.

Quindi un problema che sembrava risolto si ripresenta sotto questo aspetto abbastanza inedito ed ha già generato delle diatribe tra gli ambientalisti che si oppongono all'uccisione di questi animali proponendo ad esempio una vaccinazione ed invece chi vorrebbe eliminare drasticamente questi animali con l'abbattimento nell'intento di eliminare il serbatoio di questo tipo di micobatterio.

Bisogna anche rilevare che nel nostro microcosmo sanitario, come malattia d'importazione nell'uomo la tubercolosi provocata da *M. bovis* non è mai scomparsa. Ad esempio nell'attività analitica dell'Istituto cantonale di microbiologia in questi anni abbiamo potuto documentare 17 casi umani di importazione di tubercolosi bovina in pazienti che avevano soggiornato nei paesi europei vicini alla Svizzera come ad esempio nella Penisola iberica.

Aumento della frequenza di infezioni da MOTT

In questi anni abbiamo potuto constatare anche l'aumento della frequenza di infezioni da MOTT (micobatteri non del complesso tubercolare).

In particolare in pazienti immunodepressi sia per malattia che a causa di una terapia; ad esempio immunodeficienza patologica (HIV) o causata da

terapie oncologiche, questi micobatteri si comportano come veri “opportunisti” approfittando della minor difesa del soggetto immunodepresso. Abbiamo potuto constatare che i casi di patologie umane provocate da micobatteri non tubercolari è in costante aumento.

L'approccio con la spettrometria di massa MALDI-TOF all'Istituto cantonale di microbiologia

Il progetto condotto da Nicholas Vecchietti, sotto la guida del professor Mauro Tonolla “**Identificazione e caratterizzazione delle specie appartenenti al genere *Mycobacterium* tramite spettrometria di massa MALDI-TOF, su ceppi isolati in Cantone Ticino**” risulta avere un'implicazione clinica diretta in quanto offre la possibilità di una discriminazione rapida delle specie in seno al genere *Mycobacterium* in particolare tra i micobatteri del complesso tubercolare (specialmente *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. bovis-BCG*) e i MOTT (micobatteri non del complesso tubercolare). Questa maggior rapidità di risposta analitica permette al clinico di ridurre il periodo di isolamento del paziente ad esempio quando si è in attesa del referto definitivo di laboratorio. Infatti, dopo la prima crescita su piastra delle colonie batteriche l'analisi della massa molecolare delle proteine (proteomica) garantisce un referto affidabile, chiaro e soprattutto rapido.

Per questa indagine è stata utilizzata una tecnica analitica molto performante: la spettrometria di massa MALDI-TOF (il cui acronimo è definito nel riquadro con una succinta spiegazione tecnica).

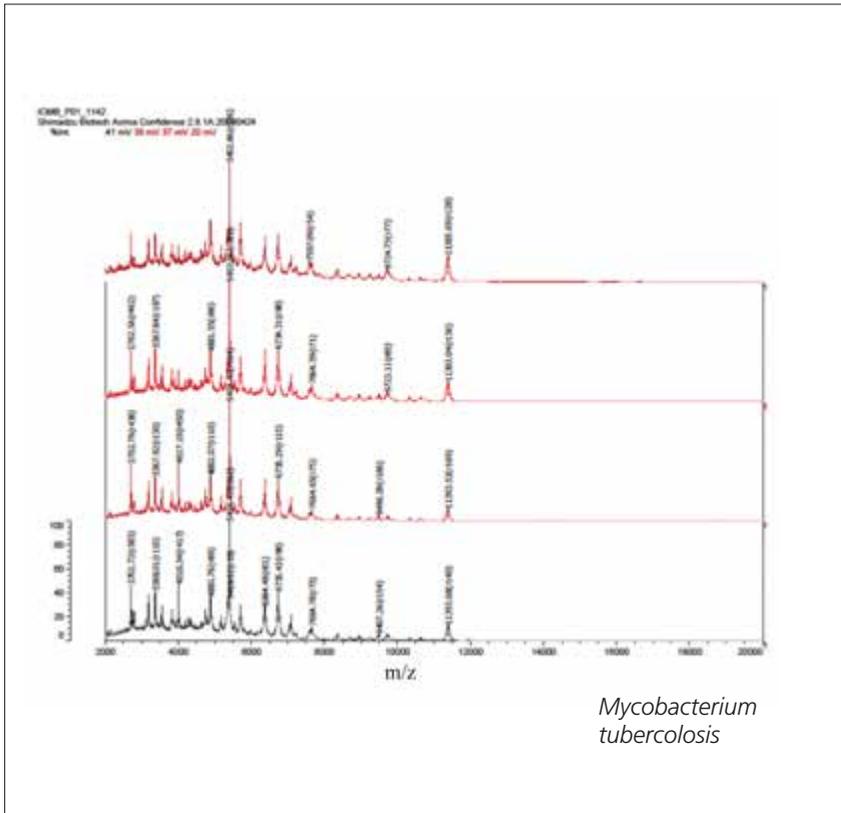
La spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) si basa sulla ionizzazione di molecole (peptidi, proteine) fissate in una matrice tramite l'azione di un laser. Gli ioni formati sono accelerati in un campo magnetico o campo elettrico e sono quindi separati in base alla loro massa (m) e alla loro carica (z) (rapporto m/z).

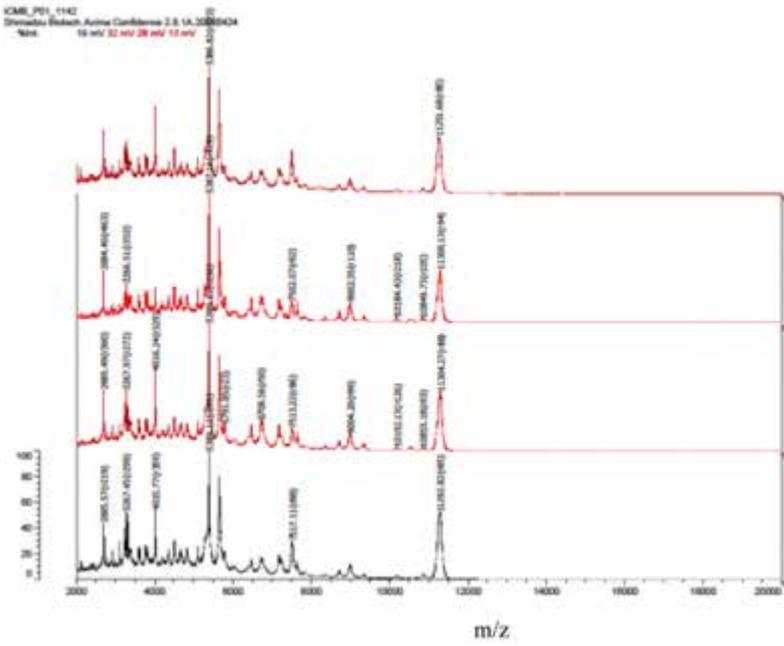
Gli spettri originati dall'analisi di miscele complesse, come una colonia batterica, sono caratterizzati da picchi diversi, tra i quali alcuni sono tipici e rappresentativi dall'unità tassonomica a cui appartiene il microorganismo analizzato.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando 11 ceppi di *Mycobacterium* di specie diverse. (Tabella 1) con l'intento di verificare l'utilizzo del MALDI-TOF MS come metodo che consenta la rapida identificazione delle specie appartenenti al genere *Mycobacterium*, e costruire una banca dati che potrebbe essere utilizzata per le analisi di diagnostica clinica.

Tabella 1: Lista dei ceppi di micobatteri utilizzata nell'applicazione del metodo spettrometria di massa MALDI-TOF

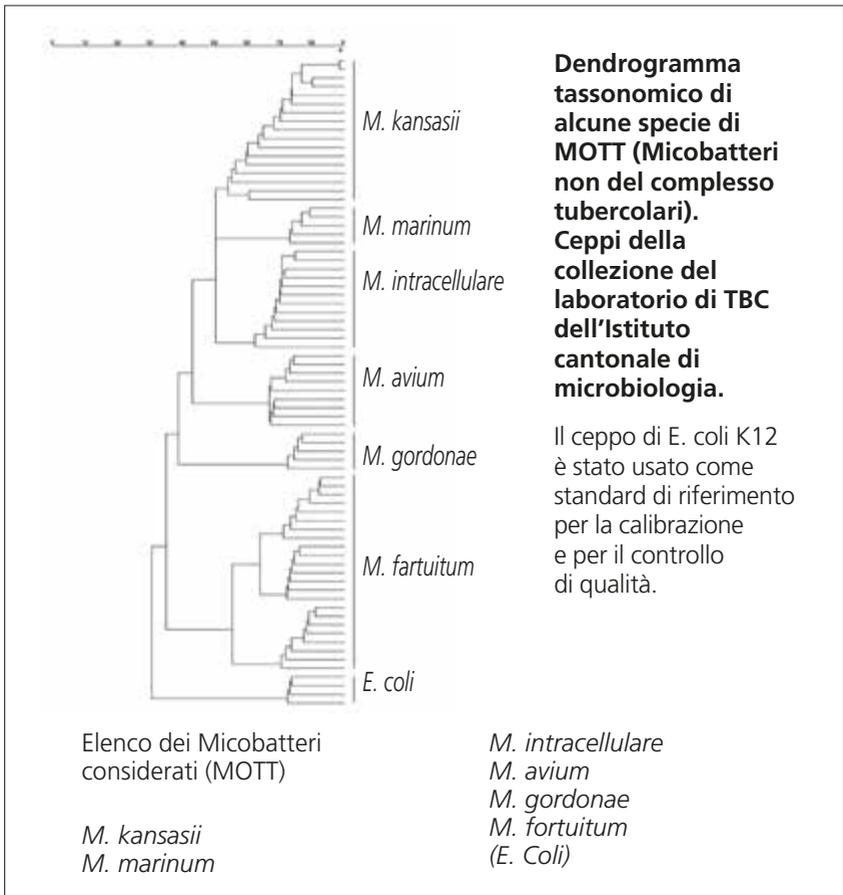
<i>Mycobacterium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. celatum</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. goodnae</i>	<i>M. intracellulare</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. marinum</i>
<i>M. terrae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. xenopi</i>





Mycobacterium avium

Esempio di profili ottenuti per le specie di *M. tuberculosis* e *M. avium* Mediante il metodo MALDI-TOFF



Richiamo sulla classificazione tassonomica del genere *Mycobacterium*

La classificazione dei *micobatteri* si divide in due gruppi principali: il primo include i micobatteri del complesso tubercolare (MTBC) che sono in grado di provocare la tubercolosi nell’uomo e negli animali. In tale gruppo ritroviamo *Mycobacterium tuberculosis* (agente eziologico della tubercolosi umana), *Mycobacterium africanum* (molto simile a *M. tuberculosis* isolato soprattutto in Africa) e *Mycobacterium bovis* (agente eziologico della tubercolosi nei bovini, che può essere trasmessa all’uomo).

Il secondo gruppo, costituito dai micobatteri del complesso non-tubercolare (NTM) anche chiamati *Mycobacteria Other Than Tuberculosis* (MOTT), comprende quei micobatteri presenti nell’ambiente che nell’uomo possono causare diverse patologie constatate spesso in pazienti immuno-compromessi; per questo sono considerati come microrganismi patogeni opportunisti.

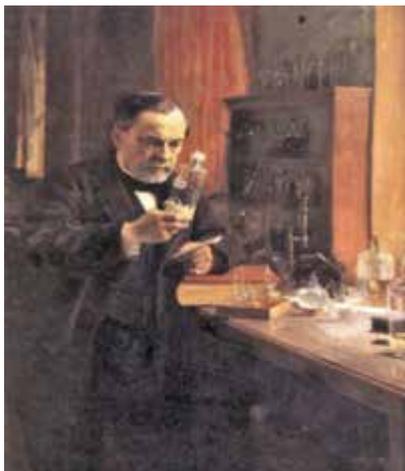
In conclusione

La possibilità di identificare in modo rapido ed affidabile i micobatteri rappresenta un grande vantaggio per la diagnosi e il trattamento delle patologie associate a questo tipo di microrganismi. Le moderne tecniche di biologia molecolare già consentono di ottenere un'identificazione rapida delle diverse specie, ma lo sviluppo della spettrometria di massa potrebbe allargare ulteriormente il campo di azione consentendo una diagnosi ancora più rapida.

Inoltre questi spettri potranno essere utilizzati come profili di riferimento per l'identificazione dei campioni che necessitano di essere analizzati per gli esami di microbiologia clinica. In questo modo potremmo avere la possibilità di accelerare l'identificazione clinica consentendo in futuro di ridurre i tempi di diagnosi. In considerazione del ritorno d'attualità delle infezioni da micobatteri (super-tubercolosi, *Micobacterium bovis* e Mott), ospedali e studi medici necessitano di ricevere informazioni precise nel più breve tempo possibile per la cura dei pazienti.

Anche in questo importante settore delle malattie infettive l'antico adagio di Pasteur è più che mai d'attualità e risulta come un monito anticipatore.

I GERMI PATOGENI RESISTONO ALL'UOMO MALGRADO L'ERA DELLE ALTE TECNOLOGIE



**Mesdames, Messieurs,
"... c'est les
microbes
qui auront le
dernier mot"**

Pasteur

"Ai microbi l'ultima parola"

Bibliografia

Abubakar, I. et coll., Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership. *The Lancet Infectious Diseases, Tuberculosis series*, 13 (4), 284-285, 2013.

Daigl Cattaneo M., Dolina M., Peduzzi R. La lotta alla Tuberculosis in Ticino. Valutazione di 30 anni d'analisi batteriologica. *Bollettino Lega polmonare ticinese, novantatreesimo Rapporto e Rendiconto*, (25-41), 2007.

Mohr K., The Drugs don't work. *Time*, (28-36), 4. march, 2013.

Office fédéral de la santé publique (OFSP), La tuberculose en Suisse de 2005 à 2009, *Bulletin* 10, (205-213), 7 mars 2011.

Office fédéral de la santé publique (OFSP), Communiqué de presse, Détail des données, cas déclarés hebdomadaires, semaine 14/2013, état au 9.04.2013.

Organisation mondiale de la Santé (OMS), Frequently asked questions – XDR-TB. Dipartimento stop TB, comunicato del 26.01.2012.

Organisation mondiale de la Santé (OMS), communiqué de presse, Journée mondiale de lutte contre la tuberculose, 24.03.2013.

Paganelli M., Tbc, l'allarme: Mancano i finanziamenti. Cure inadeguate per la forma più resistente. *La Repubblica, Salute*, 21.03.2013.

Ufficio federale di veterinaria (UFV), Tuberculosis bovina: ordinato l'abbattimento di tutta la mandria dell'azienda d'origine. Comunicato del 8.04.2013.

Vecchiotti N., Identificazione e caratterizzazione delle specie appartenenti al genere *Mycobacterium* tramite spettrometria di massa MALDI-TOF, su ceppi isolati in Cantone Ticino. Rapporto al Consiglio direttivo della Lega polmonare.

Vincent C., La tuberculose bovine est de retour en France. Une campagne de surveillance de la faune sauvage, qui menace de devenir un réservoir de la maladie, est lancée. *Article, Le Monde* del 28.02.2012.

Lugano, aprile 2013

Prof. Dr. Raffaele Peduzzi
FAMH in Microbiologia medica
Vice presidente Lega Polmonare
Via alla Campagna 9, 6900 Lugano