

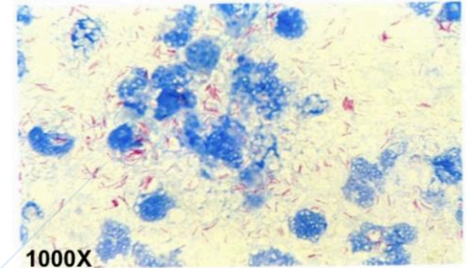
GENERE MYCOBACTERIUM

Il genere *Mycobacterium* comprende un gruppo di batteri con caratteristiche peculiari che li rendono distinti dagli altri batteri di interesse medico. L'esponente più noto è ***Mycobacterium tuberculosis***, agente eziologico della tubercolosi. Accanto a questa specie esistono numerosi altri micobatteri, raggruppati sotto la definizione di **micobatteri non tubercolari**, che non causano tubercolosi ma sono comunque responsabili di infezioni nell'uomo e negli animali.

CARATTERISTICHE GENERALI

I micobatteri sono batteri a forma di bastoncino, quindi **bacilli**. Non vengono classificati né come Gram-positivi né come Gram-negativi, ma sono definiti **alcol-acido resistenti**. Questa caratteristica tintoriale è dovuta alla particolare composizione della loro parete cellulare ed è sfruttata nella diagnostica mediante la colorazione di **Ziehl-Neelsen**, che evidenzia i bacilli in rosso su uno sfondo blu.

Dal punto di vista fisiologico, i micobatteri sono **aerobi obbligati**, crescono quindi in presenza di ossigeno, e sono immobili, in quanto privi di flagelli.



1000X

Colorazione di Ziehl-Neelsen

Crescita e replicazione

Una caratteristica fondamentale dei micobatteri è la **lentezza dei tempi di replicazione**, che varia a seconda della specie. *Mycobacterium tuberculosis* impiega circa 18 ore per duplicarsi, un tempo estremamente lungo se confrontato con batteri comuni come *Escherichia coli*, che si replica in circa 20 minuti.

Ancora più rilevante è il **tempo necessario per ottenere una colonia visibile ad occhio nudo, che richiede in media 3-4 settimane**, ma può arrivare anche a circa 40 giorni. Questa lentezza rappresenta un importante **limite diagnostico**, poiché l'esame colturale richiede tempi molto lunghi e ritarda la conferma dell'infezione.

Parete cellulare e sue conseguenze biologiche

La caratteristica più peculiare dei micobatteri è la struttura estremamente complessa della parete cellulare, che non è assimilabile a quella dei Gram+ o dei Gram-. **La parete è ricca di lipidi e cere, rendendola altamente impermeabile**. Questa composizione è responsabile sia dell'**alcol-acido resistenza**, sia della **lentezza della crescita**, poiché **limita l'ingresso dei nutrienti necessari alla replicazione batterica**.

Struttura della parete dei micobatteri

Partendo dall'interno, al di sopra della membrana citoplasmatica è presente **uno strato di peptidoglicano**. Più esternamente si trovano **polisaccaridi a lunga catena**, tra cui **arabinogalattani, lipomannani e lipoarabinomannani**, questi ultimi dotati di una componente lipidica che li ancora alla membrana.

All'esterno è presente una struttura specifica detta **micomembrana**, asimmetrica e fortemente lipidica. Essa comprende uno strato interno ricco di **acidi micolici, acidi grassi a lunga catena**, e uno strato più esterno formato da **glicolipidi e lipidi fenolici**. Nella micomembrana sono presenti anche **porine**, indispensabili per il passaggio selettivo di sostanze all'interno della cellula.

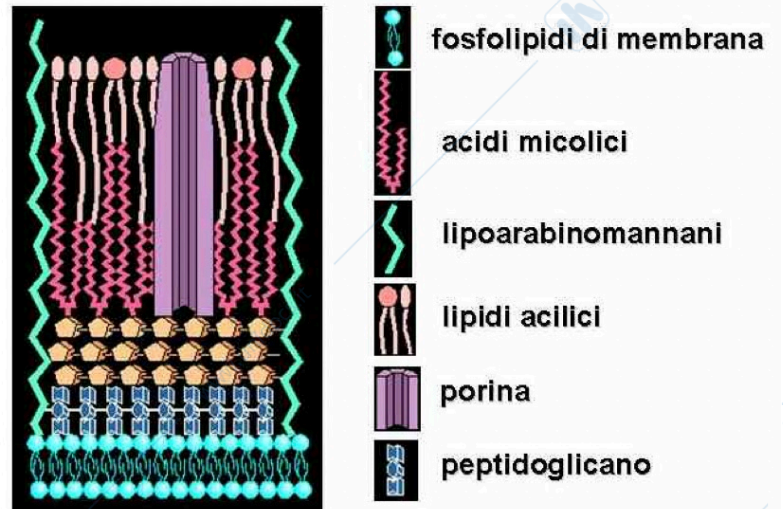


Figura 2. Rappresentazione schematica della parete dei micobatteri

Resistenza ambientale

La particolare composizione della parete rende i micobatteri **resistenti all'azione di alcol e acidi a concentrazioni moderate**. In termini di resistenza agli agenti chimici e fisici, essi si collocano immediatamente al di sotto delle spore batteriche, risultando **tra i microrganismi più resistenti**.

COLTURA DEI MICOBATTERI

I micobatteri, ad eccezione di una specie, possono essere coltivati in vitro **sia su terreni liquidi che su terreni solidi**. L'unica **eccezione è *Mycobacterium leprae*, agente eziologico della lebbra, che non è coltivabile in vitro**. Questo microrganismo si replica esclusivamente in vivo, **poiché è un patogeno intracellulare obbligato**.

Esigenze metaboliche e terreni di coltura

Gli altri micobatteri sono coltivabili su **terreni specifici che devono contenere una fonte lipidica**, poiché **il metabolismo dei lipidi in questi batteri è particolarmente rilevante**. Gli acidi grassi vengono utilizzati sia come fonte energetica, sia come precursori per la sintesi della parete cellulare.

Si utilizzano principalmente **due tipi di terreni**:

- **i terreni a base di tuorlo d'uovo**, che sono terreni **organici** complessi, forniscono direttamente gli acidi grassi necessari alla crescita dei micobatteri.

- **i terreni all'acido oleico-albumina**, che sono terreni **sintetici**, contengono come fonte lipidica l'acido oleico. In questi terreni è sempre presente anche l'albumina, poiché il metabolismo dell'acido oleico produce **metaboliti tossici che vengono neutralizzati dall'albumina** stessa.
- **Terreno di Lowenstein-Jensen** è un terreno solido di uso classico per la coltura dei micobatteri. Questo terreno ha un caratteristico colore **verdastro** dovuto alla presenza del **verde di malachite**, un agente selettivo che inibisce la crescita di altri batteri contaminanti. Le **colonie di Mycobacterium tuberculosis su questo terreno appaiono chiare, rugose e con aspetto a cavolfiore**, una morfologia tipica utile per l'identificazione preliminare.



CLASSIFICAZIONE DEI MICOBATTERI

I micobatteri vengono suddivisi in tre gruppi.

- **Il Mycobacterium tuberculosis complex**, detto anche **complesso tubercolare**, comprende un insieme di specie strettamente correlate dal punto di vista genetico e genomico, responsabili della tubercolosi nell'uomo e negli animali.
- **I micobatteri non tubercolari**, definiti anche **MOTT o micobatteri atipici**, sono micobatteri ambientali che possono infettare animali e uomo, ma non causano tubercolosi. Sono responsabili di patologie spesso polmonari, clinicamente diverse dalla tubercolosi. Attualmente si conoscono oltre 200 specie appartenenti a questo gruppo.
- **Mycobacterium leprae** viene considerato a parte, in quanto possiede caratteristiche biologiche peculiari ed è l'agente eziologico della lebbra.

COMPLESSO TUBERCOLARE

I micobatteri appartenenti al complesso tubercolare sono a lenta crescita e formano **colonie rugose, chiare e non pigmentate in circa 2-3 settimane**. Le specie che compongono questo complesso sono talmente simili dal punto di vista genetico che alcuni autori propongono di considerarle come un'unica specie con diverse varianti. Tuttavia, attualmente si continua a utilizzare la denominazione di complesso tubercolare.

Alcune specie infettano prevalentemente **l'uomo**, come **Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium africanum e Mycobacterium canettii**, quest'ultima poco diffusa.

Altre specie infettano principalmente gli **animali**, come **Mycobacterium bovis e Mycobacterium caprae**, ma possono occasionalmente infettare anche l'uomo. Un esempio rilevante è **Mycobacterium bovis**, dal quale è stato sviluppato il **vaccino antitubercolare** mediante un ceppo attenuato. In passato, prima dell'introduzione della pastorizzazione del latte, molte infezioni umane erano trasmesse attraverso il latte contaminato, poiché nel bovino questo micobatterio può causare mastiti gravi con passaggio del batterio nel latte.

MICOBATTERI NON TUBERCOLARI (MOTT)

I micobatteri non tubercolari vengono classificati secondo la **classificazione di Runyon**, che si basa su due criteri principali: la **velocità di crescita e la produzione di pigmento**.

Sulla base di questi criteri si distinguono quattro gruppi, che comprendono specie con significato clinico e specie non patogene.

- **Fotocromogeni** → i fotocromogeni sono micobatteri a lenta crescita (14-21 giorni) che producono un **pigmento giallo solo in presenza di luce**. Tra quelli di interesse clinico si trovano **Mycobacterium kansasii**, responsabile di infezioni polmonari simili alla tubercolosi, e **Mycobacterium marinum**, che infetta abitualmente i pesci ma può causare nell'uomo infezioni cutanee granulomatose, soprattutto a livello delle mani, nei soggetti che lavorano con acquari o ambienti acquatici.
- **Scotocromogeni** → gli scotocromogeni sono micobatteri a lenta crescita che producono un **pigmento giallo anche al buio**, il quale **può virare verso il rosso-arancio** quando le colonie vengono esposte **alla luce**.
- **Non fotocromogeni** → i micobatteri non fotocromogeni sono a lenta crescita e **non producono pigmento**. Tra questi, **Mycobacterium avium** è quello più frequentemente associato a infezioni nell'uomo. Nello stesso gruppo si trova **Mycobacterium ulcerans**, responsabile dell'ulcera del Buruli, una grave infezione cutanea ulcerativa, particolarmente diffusa nei bambini in alcune aree endemiche.
- **Micobatteri a rapida crescita** → Questo gruppo comprende micobatteri che **formano colonie visibili in 5-7 giorni**. Anche tra questi sono presenti specie in grado di causare infezioni nell'uomo.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS E TUBERCOLOSI

La tubercolosi è una malattia infettiva ancora oggi ampiamente diffusa a livello mondiale, con una maggiore incidenza nei Paesi in via di sviluppo. **Dal 1993 è stata dichiarata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità emergenza sanitaria globale**, una condizione che persiste da circa trent'anni.

Attualmente la tubercolosi rappresenta la seconda causa di morte per malattia infettiva al mondo, subito dopo l'infezione da HIV. Secondo i dati dell'OMS, circa 1,7 miliardi di persone nel mondo sono infette da **Mycobacterium tuberculosis**. È importante distinguere tra infezione e malattia, poiché una larga parte di queste persone presenta un'infezione latente, senza manifestazioni cliniche.

Ogni anno si stimano 50-100 milioni di nuove infezioni, con circa 10 milioni di nuovi casi di tubercolosi attiva. La mortalità annuale è di circa 1,4 milioni di persone, pari a quasi 4.000 decessi al giorno, rendendo la tubercolosi una delle principali cause di morte infettiva a livello globale.

Distribuzione geografica

La maggior parte dei casi di tubercolosi si concentra in **Asia e Africa**. Oltre il 60% dei casi mondiali si verifica in Asia, mentre in **Europa la quota è intorno al 3%**.

I Paesi con la più alta incidenza sono **India** (che rappresenta circa il 26% dei casi globali), seguita da **Cina, Indonesia, Filippine, Pakistan** e altri Paesi dell'Asia meridionale.

L'Italia è considerata un Paese a bassa incidenza: nel 2019 si registravano circa 7 casi ogni 100.000 abitanti. Tuttavia, ogni anno si osservano comunque nuovi casi, fino a **circa 40**, e non riguardano esclusivamente la popolazione immigrata: **circa la metà dei pazienti è costituita da soggetti autoctoni italiani**.

Associazione tubercolosi-HIV

Un aspetto epidemiologico di grande rilevanza è l'elevata frequenza di coinfezione tubercolosi/HIV, soprattutto in Africa e in alcune aree dell'Europa orientale e del Medio Oriente. **La tubercolosi rappresenta la più frequente infezione opportunistica associata all'AIDS** ed è la prima causa di morte AIDS-correlata a livello mondiale, essendo **responsabile di circa un terzo di tutti i decessi nei pazienti HIV-positivi**. È stato inoltre dimostrato che **la tubercolosi peggiora il decorso dell'infezione da HIV, instaurando un circolo vizioso tra immunodepressione e riattivazione dell'infezione tubercolare**.

Suscettibilità all'infezione tubercolare

L'uomo, per sua natura, è relativamente resistente all'infezione da Mycobacterium tuberculosis. Nella maggior parte dei casi l'organismo riesce a contenere il bacillo, mantenendo l'infezione in uno stato di **latenza senza evoluzione clinica**.

La suscettibilità all'infezione e alla progressione verso la malattia dipende da molteplici fattori. Un esempio storico chiarisce bene questo concetto: nel 1930, in Germania, in seguito a un errore durante una campagna vaccinale antitubercolare, 251 bambini furono inoculati con un ceppo virulento di *M. tuberculosis*, in un'epoca in cui non esistevano ancora farmaci antitubercolari.

Gli esiti furono differenti:

- circa un terzo sviluppò una tubercolosi letale;
- circa due terzi svilupparono la malattia ma guarirono;
- una piccola percentuale non sviluppò alcuna manifestazione clinica.

Questo episodio dimostra che esiste una **resistenza naturale individuale all'infezione tubercolare**.

L'andamento dell'infezione tubercolare è influenzato da diversi fattori:

- fattori **genetici** individuali;
- fattori **etnici**, poiché alcune popolazioni risultano più suscettibili;
- fattori **fisiologici**, come malnutrizione, sovraffollamento, stress ed età avanzata, condizione in cui è più frequente una riduzione dell'efficienza del sistema immunitario;
- **farmaci**, in particolare i corticosteroidi;
- **malattie concomitanti**, come silicosi, infezione da HIV/AIDS e neoplasie.

Meccanismi patogenetici di Mycobacterium tuberculosis

I meccanismi patogenetici di *M. tuberculosis* non sono ancora completamente chiariti. È noto che il bacillo tubercolare non produce tossine classiche, come molti altri batteri patogeni. La sua **virulenza** è quindi **multifattoriale**.

Un elemento centrale della patogenesi è la capacità del micobatterio di **resistere all'azione battericida dei macrofagi** e di replicarsi all'interno di essi, **instaurando una replicazione intracellulare**.

Tra i fattori che contribuiscono alla patogenicità di *M. tuberculosis* si conoscono in particolare:

- **Il fattore cordale, o trealosio dimicolato**, un componente lipidico della parete (derivato dagli acidi micolici), che è **in grado di inibire la fusione tra fagosoma e lisosoma**. In questo modo il batterio evita la distruzione all'interno del macrofago. Questo fattore prende il nome di "**cordale**" perché induce l'**aggregazione dei bacilli in strutture a cordone**.
- **L'ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target 6)**, un antigene espresso precocemente, che **favorisce la fuoriuscita del batterio dal fagosoma verso il citoplasma**, dove può replicarsi. È coinvolta anche una fosfolipasi, il cui ruolo preciso non è ancora completamente chiarito.

Trasmissione della tubercolosi

Quando si parla di tubercolosi si pensa prevalentemente alla forma polmonare, che è effettivamente la più frequente. Tuttavia, **Mycobacterium tuberculosis è in grado di replicarsi in quasi tutti i tessuti dell'organismo**, con pochissime eccezioni.

La trasmissione avviene quasi esclusivamente per via aerogena, attraverso l'**inalazione di bacilli aerosolizzati emessi da un soggetto infetto durante tosse, starnuti o anche semplicemente parlando**. I **droplets** contenenti i bacilli vengono emessi in grande quantità, circa **3.000 per ogni colpo di tosse**, e possono rimanere sospesi nell'aria anche per diverse ore.

Per determinare l'infezione è sufficiente una carica batterica molto bassa. L'infezione si instaura tipicamente in seguito a un **contatto stretto e prolungato** tra una persona sana e una persona infetta. Si stima che circa il 30% dei soggetti esposti contragga l'infezione.

Esito dell'infezione

Dopo l'infezione possono verificarsi due principali scenari:

- **Nella grande maggioranza dei casi (circa 95%), l'infezione rimane latente**. I macrofagi alveolari riescono a uccidere o contenere i bacilli e l'attivazione dell'immunità innata è sufficiente a controllare l'infezione. In questi soggetti non compaiono sintomi clinici, anche se l'infezione può riattivarsi in futuro.
- **In circa il 5% dei casi, invece, l'infezione evolve in tubercolosi attiva**, generalmente entro due anni dal contatto con il soggetto infetto.

La progressione verso l'infezione attiva dipende da diversi fattori:

- **virulenza del ceppo batterico;**
- **carica infettante inalata;**
- **caratteristiche dell'ospite, in particolare lo stato immunitario:** i soggetti immunocompromessi hanno un rischio molto più elevato di sviluppare tubercolosi attiva fin dall'inizio.

Patogenesi dell'infezione tubercolare

In seguito all'esposizione, il soggetto:

- **può non infettarsi** se i macrofagi alveolari riescono a uccidere il batterio.
- se invece **l'infezione si instaura**, i macrofagi fagocitano i micobatteri, ma **alcuni bacilli resistono alla distruzione**, continuano a replicarsi e **proliferano anche nello spazio extracellulare**. Questo porta al **reclutamento di cellule infiammatorie** e all'attivazione dell'**immunità specifica cellulo-mediata**. I micobatteri resistenti inducono l'attivazione dei linfociti T CD4+, che orchestrano una **risposta di tipo granulomatoso**. Quando interviene l'immunità cellulo-mediata, i macrofagi presentano gli antigeni micobatterici associati alle molecole di MHC, attivando i linfociti T e una cascata di citochine.
 - **Nel 95% dei casi, questa risposta immunitaria riesce a contenere l'infezione**, che rimane latente e asintomatica.
 - **Nel 5% dei casi, invece, la risposta immune non è sufficiente** a controllare la replicazione dei bacilli e si sviluppa una **tubercolosi attiva**; questi soggetti sono contagiosi.

Riattivazione dell'infezione latente

L'infezione latente può riattivarsi nel corso della vita. Questo avviene in circa il 5% dei soggetti, mentre nella restante parte dei casi l'infezione rimane latente per tutta la vita. Il rischio di riattivazione aumenta notevolmente nei soggetti immunodepressi.

Ruolo dei linfociti T

I linfociti T, in particolare i **CD4+**, svolgono un ruolo centrale nella risposta contro *Mycobacterium tuberculosis*. Essi rappresentano l'elemento chiave dell'**immunità cellulo-mediata**, fondamentale per il controllo dell'infezione tubercolare.

I linfociti CD4+ riconoscono gli antigeni micobatterici presentati da macrofagi e cellule dendritiche in associazione a MHC e producono **interferone gamma (IFN- γ)**, una citochina essenziale per l'attivazione dei macrofagi e il contenimento dell'infezione.

Tutti i fattori che riducono l'efficacia dei linfociti T CD4+ favoriscono quindi lo sviluppo di tubercolosi attiva, come infezione da HIV, età avanzata e terapia cortisonica immunosoppressiva.

GRANULOMA TUBERCOLARE E TUBERCOLOSI ATTIVA

Poiché il sistema immunitario non riesce a eliminare completamente i micobatteri, tende a confinarli all'interno di strutture organizzate chiamate **granulomi o tubercoli**. All'interno del granuloma i bacilli entrano in uno stato di **dormienza**.

Nella tubercolosi attiva, invece il granuloma non si forma in modo efficace e si verifica **necrosi colliquativa** del granuloma; i micobatteri si replicano, fuoriescono e danno origine a nuovi **granulomi che possono confluire tra loro**. In questa fase il paziente è bacillifero, cioè elimina bacilli con l'espettorato ed è *altamente contagioso*.

Dalla fase di tubercolosi attiva i micobatteri possono raggiungere il circolo ematico e disseminarsi in altri organi. Quando la disseminazione interessa numerosi tessuti e organi si parla di **tubercolosi miliare**.

Infezione tubercolare

In seguito all'inalazione, i micobatteri raggiungono gli alveoli polmonari, dove vengono fagocitati dai macrofagi alveolari. All'interno di queste cellule i bacilli riescono a sopravvivere e moltiplicarsi, resistendo all'azione battericida dei macrofagi. Si instaura quindi un **equilibrio tra l'attività fagocitaria dei macrofagi e i meccanismi di evasione del micobatterio, che ne consente la sopravvivenza**.

Non si ha infezione quando i macrofagi riescono a eliminare completamente i batteri.

Se questo non avviene, si attiva una risposta immunitaria cellulo-mediata, che, grazie all'azione dei linfociti T CD4+, porta al **potenziamento dei macrofagi e alla formazione di un granuloma, detto tubercolo**, nella sede della lesione primaria.

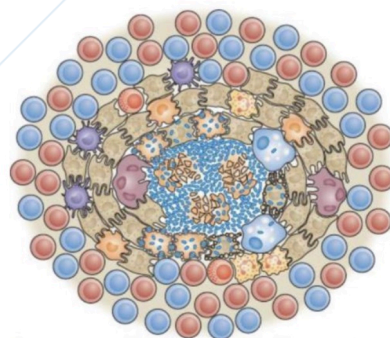
Il contenimento dei micobatteri all'interno del granuloma blocca la progressione dell'infezione, che rimane **latente**. In questa condizione i micobatteri sono vitali ma **dormienti**, non si replicano e possono rimanere tali anche per tutta la vita, senza dare malattia. Tuttavia, l'infezione latente può riattivarsi in determinate condizioni.

Se invece anche la risposta immunitaria cellulo-mediata non è sufficiente, il granuloma si forma ma non è in grado di contenere efficacemente l'infezione. **Il batterio continua a replicarsi e si sviluppa una necrosi caseosa, che porta alla colliquazione del granuloma. I micobatteri diffondono nel tessuto polmonare, si formano nuovi granulomi che tendono a fondersi tra loro, dando origine a caverne**. In questo caso si parla di **tubercolosi attiva**: il paziente è contagioso perché elimina bacilli con l'espettorato. Inoltre, i micobatteri possono raggiungere il **circolo ematico e disseminarsi ad altri organi**, dando luogo a forme come la tubercolosi miliare, meningea, renale e ossea.

Granuloma tubercolare

Il granuloma è una struttura organizzata formata da più **zone concentriche**:

- **La zona centrale** contiene **micobatteri, detriti cellulari e materiale necrotico**. All'interno del granuloma, in particolare nella zona centrale, **l'ambiente è povero di ossigeno**; in queste condizioni i micobatteri rimangono in stato di dormienza (il granuloma può quindi avere un ruolo protettivo oppure andare incontro a rottura e favorire la progressione della malattia).
- Attorno ad essa si trova una **zona intermedia**, composta da **macrofagi, cellule dendritiche, cellule giganti di Langhans** (multinucleate, derivate dalla fusione di più macrofagi) e **cellule epitelioidi**, cioè macrofagi che hanno subito modificazioni morfologiche.
- Più **esternamente** è presente una **zona ricca di linfociti**, seguita da uno **strato fibrotico** che delimita la lesione.



Risposta immunitaria e destino del granuloma

La formazione di un granuloma protettivo è favorita dall'azione di macrofagi e cellule dendritiche, che presentano gli antigeni micobatterici (associati a MHC di classe II) ai **linfociti T CD4+**, i quali si differenziano in specifiche sottopopolazioni:

- I **linfociti Th1** producono interferone gamma (IFN- γ), che attiva i macrofagi e contribuisce al controllo dell'infezione.
- I **linfociti Th17** producono IL-17, che favorisce il reclutamento e l'attivazione dei neutrofili.

Contribuiscono inoltre i linfociti **T citotossici**, attivati dal riconoscimento di antigeni presentati in associazione a MHC di classe I.

Al contrario, alcune popolazioni cellulari e citochine favoriscono l'evoluzione dell'infezione, come i linfociti Th2, che producono IL-4 e regolano negativamente l'attività dei Th1, e le citochine IL-10 e TGF- β , che esercitano un'azione immunosoppressiva.

Tubercolosi latente e tubercolosi attiva

La tubercolosi può essere rappresentata come un iceberg. La parte emersa corrisponde alla **tubercolosi attiva**, che rappresenta solo una piccola quota delle infezioni totali. È definita come **infezione clinicamente, radiologicamente e microbiologicamente evidente, con possibilità di isolamento dei bacilli dall'espettorato**. Ogni anno si registrano circa 8–10 milioni di nuovi casi.

La parte sommersa dell'iceberg rappresenta la **tubercolosi latente**, che comprende circa 2 miliardi di persone. In questi soggetti **l'infezione non è evidente né clinicamente né radiologicamente né microbiologicamente, e non si riscontrano bacilli nell'espettorato**.

Le persone con infezione latente costituiscono un importante serbatoio, poiché molti nuovi casi di tubercolosi attiva derivano da riattivazioni dell'infezione. Per questo è fondamentale individuare e monitorare le infezioni latenti e stabilire in quali condizioni sia indicata una terapia antitubercolare preventiva.

VACCINO ANTITUBERCOLARE

È disponibile un vaccino antitubercolare, il **BCG (Bacillo di Calmette-Guérin)**, introdotto circa 100 anni fa e mai modificato. Il fatto che la tubercolosi sia ancora oggi una delle principali emergenze sanitarie indica che questo vaccino ha un'**efficacia limitata**.

Il BCG è un **vaccino vivo attenuato**, costituito da un ceppo di Mycobacterium bovis isolato da una mastite bovina e attenuato tramite 254 passaggi in coltura su un terreno a base di patata biliata e glicerinata. Il sequenziamento genomico ha mostrato che **il ceppo vaccinale ha perso 14 regioni genomiche (RD1–RD14) contenenti geni per fattori di virulenza**. In particolare, **la regione RD1, assente nel BCG, codifica per ESAT-6, coinvolto nella fuoriuscita del batterio dal fagosoma**.

Il vaccino viene somministrato per **via intradermica** e, trattandosi di un vaccino vivo, **induce dopo 2–3 settimane una reazione locale con formazione di un nodulo cutaneo**, che guarisce spontaneamente dopo alcuni mesi.

Come tutti i vaccini vivi, il BCG è controindicato nei soggetti immunodepressi e nelle donne in gravidanza. Un ulteriore limite è la grande variabilità dell'efficacia nell'adulto: in alcune campagne vaccinali la protezione è risultata nulla, mentre in altre ha raggiunto valori prossimi all'80%.

Nonostante questi limiti, il BCG è ancora utilizzato perché **non esistono alternative** migliori e perché è molto efficace nei bambini nel prevenire le forme più gravi di tubercolosi, in particolare la tubercolosi meningea e la tubercolosi miliare.

FARMACI ANTITUBERCOLARI

A causa della struttura particolare della parete, ricca di lipidi e cere, Mycobacterium tuberculosis è **naturalmente resistente a molti antibiotici**. Tuttavia, alcuni ceppi risultano sensibili a specifici farmaci di prima linea, detti anche di prima scelta, che rappresentano la base della terapia antitubercolare.

Tra i **principali farmaci di prima linea** si distinguono:

- **L'isoniazide** è un farmaco **battericida** che agisce **inibendo la sintesi degli acidi micolici** della parete cellulare.
- **La rifampicina** è un battericida che **inibisce la subunità β dell'RNA polimerasi**, bloccando la trascrizione e quindi la sintesi proteica. È efficace anche sui batteri intracellulari.
- **L'etambutolo** è un farmaco **batteriostatico**; il suo meccanismo d'azione non è completamente chiarito, ma si ritiene che inibisca la sintesi della componente glucidica della parete. È particolarmente attivo sui batteri in rapida moltiplicazione.
- **La pirazinamide** è un battericida che agisce soprattutto in ambiente acido ed è **efficace sui micobatteri intracellulari**.

Oltre ai farmaci di prima linea, esistono altri antitubercolari suddivisi in gruppo A, gruppo B e gruppo C, utilizzati soprattutto nei casi di resistenza.

Farmacoresistenza del bacillo tubercolare

Negli ultimi anni M. tuberculosis ha sviluppato una crescente farmacoresistenza verso molti farmaci antitubercolari.

Questa resistenza è dovuta esclusivamente a mutazioni cromosomiche: non sono presenti plasmidi di resistenza, ma solo mutazioni spontanee del genoma batterico.

In una popolazione di M. tuberculosis, le mutazioni responsabili di resistenza insorgono spontaneamente con una frequenza compresa, a seconda del farmaco, tra 10^{-6} e 10^{-8} .

Poiché in una singola lesione tubercolare possono essere presenti 10^8 – 10^{10} unità formanti colonia (CFU), **l'utilizzo di almeno due farmaci in associazione riduce drasticamente, o annulla, la probabilità di selezionare mutanti resistenti**.

Ad esempio, se la frequenza di mutanti resistenti al farmaco A è 10^{-6} e quella al farmaco B è 10^{-7} , la probabilità di avere un mutante resistente contemporaneamente ad A e B è 10^{-13} , valore inferiore al numero totale di bacilli presenti nella lesione.

Selezione dei ceppi resistenti

La proporzione di mutanti farmaco-resistenti può aumentare rapidamente a causa della **pressione selettiva esercitata da terapie inappropriate**, in particolare in caso di:

- monoterapia;
- terapia discontinua;
- utilizzo di farmaci verso cui il ceppo è già resistente.

È stato dimostrato che esiste una correlazione tra la percentuale di ceppi resistenti in una popolazione batterica e la risposta clinica alla terapia antibiotica.

- Se la **percentuale di micobatteri resistenti è inferiore all'1%, il farmaco risulta efficace.**
- Se la percentuale di micobatteri resistenti è superiore all'1%, la terapia con quel farmaco fallisce.

Lo scopo dell'antibiogramma è quindi valutare se la proporzione di ceppi resistenti sia inferiore o superiore all'1%, per guidare la scelta terapeutica.

Si distinguono **diverse categorie di ceppi resistenti:**

- **I ceppi MDR** (multidrug resistant) sono **resistenti ad isoniazide e rifampicina**, due dei principali farmaci di prima linea. In questi casi si ricorre all'uso di farmaci del gruppo A.
- **I ceppi pre-XDR** sono resistenti a isoniazide e rifampicina e **anche ai fluorochinoloni, che appartengono al gruppo A.**
- **I ceppi XDR** (extensively drug resistant) sono resistenti non solo a isoniazide e rifampicina, ma **anche ai fluorochinoloni e ad almeno uno dei farmaci del gruppo A.**

Un elemento importante da considerare è la presenza di ceppi resistenti alla sola rifampicina, che rappresenta un marcatore precoce dello sviluppo di resistenza multipla.

Situazione epidemiologica in Italia

L'Italia, come la maggior parte dei Paesi europei, è considerata un **Paese a bassa prevalenza di ceppi MDR**. La **percentuale di ceppi multidrug-resistenti non supera generalmente il 2-3%.**

DIAGNOSI DI TUBERCOLOSI

Nella tubercolosi è fondamentale **distinguere** due diversi ambiti diagnostici, che rispondono a obiettivi differenti: **la diagnosi di infezione tubercolare latente e la diagnosi di tubercolosi attiva.**

I test utilizzati nei due contesti non sono sovrapponibili, poiché la presenza dell'infezione non coincide necessariamente con la presenza della malattia clinicamente manifesta.

Diagnosi di infezione tubercolare latente

La diagnosi di infezione latente ha lo scopo di identificare soggetti che sono entrati in contatto con *Mycobacterium tuberculosis* e hanno sviluppato una **risposta immunitaria specifica, pur non presentando segni clinici di malattia.**

Per questo tipo di diagnosi si utilizzano due principali metodiche: il test tubercolinico e i test IGRA.

- **Test tubercolinico (reazione di Mantoux)**→ Il test tubercolinico, noto anche come intradermoreazione alla tubercolina o reazione di Mantoux, è un test storico, utilizzato da molti decenni. Esso consiste nell'**inoculazione intradermica, generalmente a livello dell'avambraccio, di una miscela di antigeni derivati dal bacillo tubercolare.** In origine veniva utilizzata la cosiddetta **tubercolina di Koch**, ottenuta da colture liquide di *Mycobacterium tuberculosis* sterilizzate in autoclave, concentrate mediante calore e successivamente filtrate. Questo preparato, tuttavia, risultava piuttosto grezzo e spesso responsabile di reazioni avverse immediate. Per questo motivo è stato **sostituito dal PPD (Purified Protein Derivative)**, una miscela di proteine tubercolari purificate, meglio tollerata. Dopo l'inoculazione del PPD, se il soggetto è entrato in contatto in passato con il bacillo tubercolare, il suo sistema immunitario è in grado di riconoscere nuovamente questi antigeni. In particolare, le cellule T della memoria si attivano e danno luogo a una **risposta immunitaria cellulo-mediata di tipo ritardato.** Questa risposta si manifesta clinicamente con la comparsa di una **papula** nel sito di inoculo dopo 48-72 ore. Trascorso questo intervallo di tempo, il soggetto deve tornare per la lettura del test, che consiste nella misurazione del **diametro dell'indurimento** (e non dell'eritema). Il test viene considerato positivo **quando il diametro dell'indurimento supera 1 cm.** Dal punto di vista immunologico, gli antigeni inoculati vengono presentati alle cellule T CD4+ già sensibilizzate, che producono interferone gamma (IFN- γ). Questa citochina determina il reclutamento di cellule infiammatorie responsabili dell'indurimento e dell'arrossamento locale. La positività del test indica che l'individuo ha avuto un contatto con *M. tuberculosis*, ma **non consente di distinguere se si tratti di un'infezione latente asintomatica oppure di un'infezione attiva in atto. Per questo motivo il test non è sufficiente, da solo, per porre diagnosi di malattia.**

Un ulteriore limite è rappresentato dal fatto che **il test risulta positivo anche nei soggetti vaccinati con BCG**, poiché alcuni antigeni presenti nel PPD cross-reagiscono con antigeni del ceppo vaccinale. Inoltre, essendo il PPD una miscela di proteine, sono frequenti anche **falsi positivi dovuti a infezioni da micobatteri ambientali non tubercolari.** Il test può dare **anche falsi negativi**, in particolare nei **soggetti immunodepressi**, nei quali i linfociti T CD4+ non sono in grado di rispondere adeguatamente, nei casi di infezione tubercolare molto recente, oppure **nei bambini di età inferiore ai 6 mesi**, nei quali il sistema immunitario non è ancora pienamente maturo.

Il principale vantaggio del test tubercolinico è il costo molto basso. Tuttavia, presenta numerosi svantaggi: bassa specificità, bassa sensibilità, incapacità di distinguere tra infezione latente e attiva e necessità che il paziente si presenti due volte per l'esecuzione e la lettura del test. Per questi motivi, il test di Mantoux presenta limiti significativi.

- **Test IGRA (Interferon-Gamma Release Assays)**→ Per superare i limiti del test cutaneo, negli ultimi anni sono stati sviluppati i test IGRA, che **sono test in vitro basati sulla valutazione del rilascio di interferone gamma (IFN- γ) da parte dei linfociti T in risposta a specifici antigeni tubercolari.** Questi test **utilizzano esclusivamente due proteine, ESAT-6 e CFP-10, che sono antigeni T immunodominanti codificati nella regione genomica RD1.** Questa regione è assente nel vaccino BCG e nei micobatteri non tubercolari, motivo per cui **i test IGRA non risultano positivi nei soggetti vaccinati e non sono influenzati dalla presenza di micobatteri ambientali.** Ciò comporta un netto aumento della specificità diagnostica.

Il test IGRA più utilizzato è il **QuantIFERON-TB Gold**, impiegato soprattutto come test di screening. Esso prevede un prelievo di sangue intero, che viene distribuito in specifiche provette contenenti antigeni tubercolari e successivamente incubato per 16-24 ore. Se il soggetto è stato infettato da *M. tuberculosis*, nel suo sangue sono presenti linfociti T specifici che, a contatto con gli antigeni, producono IFN- γ . La quantità di IFN- γ rilasciata viene successivamente misurata tramite ELISA o chemiluminescenza.

Per l'esecuzione del test vengono utilizzate **quattro provette**:

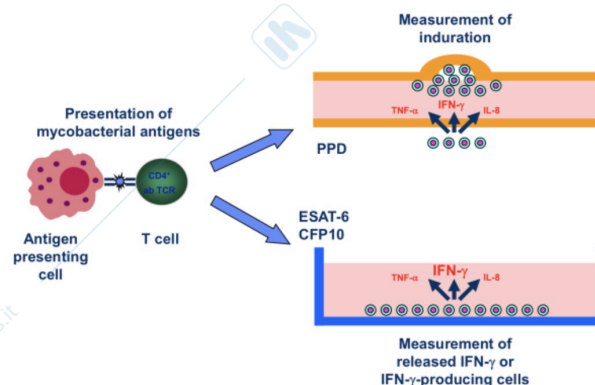
- una provetta rappresenta il **controllo negativo** e non contiene antigeni: in questo caso non deve esserci produzione di IFN- γ , altrimenti si sospetta un'attivazione aspecifica dei linfociti.
- una seconda provetta è il **controllo positivo** e contiene un mitogeno, cioè una sostanza che stimola aspecificamente i linfociti T. Questa provetta deve risultare positiva per dimostrare che i linfociti del paziente sono funzionali; se risulta negativa, come può accadere nei soggetti immunodepressi, il test non è attendibile.
- la **provetta TB1** contiene peptidi di ESAT-6 e CFP-10 che stimolano principalmente i linfociti T CD4+. Essa risulta positiva sia nei casi di infezione latente sia in quelli di infezione attiva.
- la **provetta TB2** contiene gli stessi antigeni più ulteriori peptidi in grado di stimolare anche i linfociti T CD8+. Nei soggetti con tubercolosi attiva, la risposta in questa provetta è generalmente più intensa, poiché alla produzione di IFN- γ contribuiscono anche i CD8+. Questo rappresenta un ulteriore elemento discriminante rispetto al test cutaneo.

Dopo l'incubazione a 37 °C, le provette vengono centrifugate e si misura la concentrazione di IFN- γ presente nel plasma.

Rispetto al test tubercolinico, i test IGRA presentano numerosi vantaggi.

Hanno una sensibilità elevata, intorno al 95%, e una specificità molto maggiore, grazie all'utilizzo di antigeni esclusivi di *M. tuberculosis*. Essendo test in vitro, richiedono una sola visita del paziente, evitando il problema della mancata lettura tipico del test cutaneo.

Gli svantaggi principali dei test IGRA sono il costo più elevato e il fatto che, nonostante la maggiore accuratezza, non sempre consentono di distinguere in modo assoluto tra infezione latente e infezione attiva.



Diagnosi di infezione tubercolare attiva

Sebbene il test IGRA possa fornire indicazioni utili e in alcuni casi aiutare a distinguere tra infezione latente e infezione attiva, la diagnosi ottimale di tubercolosi attiva è una **diagnosi microbiologica diretta**, finalizzata alla **ricerca del bacillo tubercolare nei campioni clinici del paziente**.

Il gold standard diagnostico è rappresentato dall'isolamento culturale di *Mycobacterium tuberculosis* a partire dal campione clinico.

Questo approccio, tuttavia, è fortemente condizionato dai **lunghi tempi di replicazione del micobatterio**, che rendono la diagnosi culturale lenta.

Approccio diagnostico sul campione clinico

Quando un campione clinico arriva in laboratorio, è possibile eseguire diversi livelli di analisi microbiologica.

In primo luogo si può effettuare un **esame batterioscopico diretto, utilizzando la colorazione di Ziehl-Neelsen** o altre colorazioni specifiche per i micobatteri. Questo esame consente di ottenere rapidamente un'indicazione sulla presenza o assenza di bacilli alcol-acido resistenti nel campione.

Successivamente **si procede con l'isolamento culturale**, che rappresenta il test di riferimento ed è l'approccio più sensibile per la diagnosi di tubercolosi attiva.

In parallelo o in fase successiva, è possibile effettuare l'**identificazione della specie micobatterica oppure l'amplificazione genica mediante test molecolari**. Questi test hanno un grande valore diagnostico, poiché permettono una diagnosi rapida in presenza di un batterio a crescita lenta. Tuttavia, non possono sostituire l'isolamento culturale, poiché **non raggiungono lo stesso livello di sensibilità** e non forniscono informazioni complete sulla vitalità del microrganismo. Per questo motivo, quando eseguiti, devono essere affiancati alla cultura.

1) Trattamento preliminare del campione ed esame microscopico

Prima dell'analisi microbiologica, il campione clinico deve essere trattato, in particolare quando proviene da distretti polimicrobici o quando si tratta di espettorato, che è contaminato dalla saliva.

Il trattamento ha lo scopo di decontaminare il campione eliminando i batteri contaminanti e di fluidificarlo, rendendo omogenea la sospensione e facilitando le successive analisi.

Sul campione trattato viene eseguito l'**esame microscopico diretto**, che rappresenta un esame di grande utilità pratica. È una metodica rapida, poco costosa e accessibile a praticamente tutti i laboratori, ma presenta una sensibilità limitata.

Nonostante questo limite, l'esame microscopico ha un valore clinico fondamentale: **la presenza di bacilli nell'espettorato indica che il soggetto è bacillifero, cioè potenzialmente altamente contagioso**. Questo dato deve essere comunicato immediatamente al reparto, affinché il paziente venga posto in isolamento.

2) Isolamento culturale e fasi successive

Dopo l'esame microscopico, si procede con l'**isolamento culturale, che viene effettuato sia su terreni liquidi sia su terreni solidi**.

In caso di crescita positiva, si prosegue con:

- **identificazione** della specie micobatterica;
- **antibiogramma**, per valutare la suscettibilità del ceppo ai farmaci antitubercolari.

*Il test molecolare di amplificazione genica specifico per *Mycobacterium tuberculosis* viene eseguito solo quando richiesto. Anche questo test è rapido e più sensibile dell'esame microscopico diretto, ma è più costoso e non sostituisce la cultura.*

Tipi di campioni clinici

I campioni idonei per la ricerca del bacillo tubercolare sono numerosi, poiché *M. tuberculosis* è in grado di replicarsi in quasi tutte le sedi dell'organismo. Tuttavia, **vengono privilegiati i campioni di origine respiratoria**, poiché la forma polmonare è la più frequente.

Tra questi rientrano:

- espettorato spontaneo,
- bronco-lavaggio,
- bronco-aspirato,
- espettorato indotto.
- Nei pazienti pediatrici, nei quali l'espettorato è difficile da ottenere, si utilizzano anche l'aspirato gastrico e, in alcuni casi, campioni fecali, poiché i bacilli possono essere presenti nel canale alimentare a seguito della deglutizione dell'espettorato.
- *Un caso particolare riguarda l'utilizzo del BCG come immunomodulatore nel carcinoma della vescica. In questi pazienti può verificarsi un'infezione a livello urinario e il ceppo micobatterico può essere isolato anche dalle urine.*

Modalità di prelievo dei campioni e decontaminazione

Nel caso di campioni poco invasivi come l'espettorato, vengono **richiesti tre campioni raccolti in tre giorni consecutivi**. Questo perché **anche un paziente con tubercolosi attiva rilascia bacilli in maniera intermittente**, e l'analisi di più campioni aumenta significativamente la probabilità di ottenere almeno un risultato positivo.

La maggior parte dei campioni deve essere sottoposta a **decontaminazione**, generalmente **mediante NaOH al 2% associato a N-acetilcisteina**, che agisce come **agente fluidificante**. Questo trattamento è particolarmente importante per l'espettorato, ma viene applicato a quasi tutti i campioni, ad eccezione di sangue e liquor.

Il NaOH al 2% è efficace contro la maggior parte dei batteri contaminanti, mentre **i micobatteri risultano relativamente resistenti a questo trattamento. Dopo 15 minuti di incubazione, è necessario aggiungere una soluzione tampone per neutralizzare l'idrossido di sodio ed evitare danni anche ai micobatteri.**

Il campione viene lavorato in provette da 50 ml, portato a volume con un tampone fosfato e successivamente centrifugato, poiché risulta fortemente diluito rispetto al volume iniziale. Dopo la centrifugazione si elimina il surnatante e il sedimento viene utilizzato per l'esame microscopico, colturale e molecolare.

Esame batterioscopico: colorazioni utilizzate

Per l'esame batterioscopico diretto si utilizzano tre principali tecniche di colorazione.

- La colorazione di **Ziehl-Neelsen**, che sfrutta la proprietà di alcol-acido resistenza dei micobatteri.
- La colorazione di **Kinyoun**, simile alla precedente, nella quale la fucsina penetra nei micobatteri grazie all'aggiunta di una sostanza chimica, senza necessità di riscaldamento.
- La colorazione con **fluorocromi**, che si legano in maniera specifica agli acidi micolici della parete micobatterica. Questa metodica richiede un microscopio a fluorescenza ed è considerata **la più sensibile tra le colorazioni disponibili**.

Vantaggi e limiti dell'esame microscopico

L'esame microscopico diretto presenta diversi vantaggi: è semplice, rapido e specifico per il genere micobatterico, anche se **non consente l'identificazione della specie**.

Tuttavia, presenta importanti limiti. Ha una **bassa sensibilità**, che dipende dal tipo di campione (i campioni extrapolmonari sono meno sensibili) e dalla tecnica di colorazione utilizzata. Inoltre, **può dare falsi positivi dovuti alla presenza di bacilli morti, poiché l'osservazione microscopica non fornisce informazioni sulla vitalità dei microrganismi**.

Per questo motivo non può essere utilizzato per il monitoraggio della terapia.

Nonostante ciò, l'esame microscopico **è ampiamente utilizzato per la sua estrema rapidità:**

in presenza di bacilli si può avvisare immediatamente il clinico, mentre l'isolamento colturale richiede in media circa 12 giorni.

La diagnosi di tubercolosi viene quindi inizialmente posta su base clinica, mentre l'analisi microbiologica ha un ruolo di conferma, proprio a causa dei tempi lunghi della coltura.

Nel referto dell'esame microscopico non viene fornito un valore numerico preciso, ma una **stima semiquantitativa basata sul numero di bacilli osservati nei campi microscopici, espressa con un numero di segni "+", da uno fino a un massimo di quattro**.

La presenza di micobatteri all'esame microscopico diretto su un campione respiratorio è indice di elevata infettività del paziente.

Affinché l'esame risulti positivo, devono essere presenti almeno 10.000–50.000 bacilli per millilitro, il che spiega la scarsa sensibilità, soprattutto nei campioni extrapolmonari.

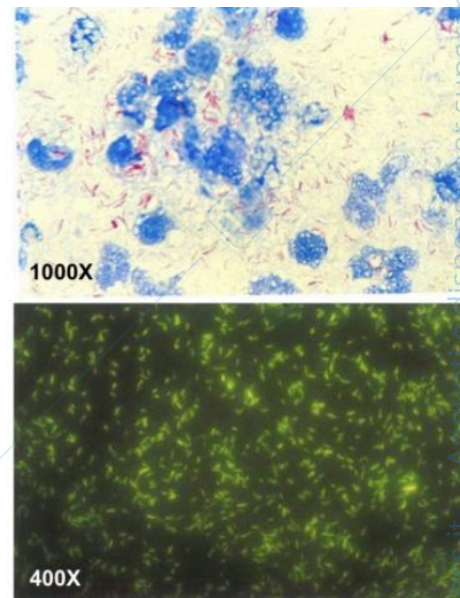
Isolamento colturale e terreni utilizzati

L'isolamento colturale rappresenta il gold standard per la diagnosi microbiologica della tubercolosi, poiché **consente di dimostrare in modo diretto la presenza di Mycobacterium tuberculosis vitale nel campione clinico del paziente**. Per l'isolamento vengono utilizzati terreni solidi e terreni liquidi, che vengono sempre impiegati in parallelo, poiché forniscono informazioni complementari.

Nei terreni solidi il tempo necessario per osservare la crescita è lungo e varia generalmente tra 3 e 4 settimane, a causa della lentezza replicativa del bacillo tubercolare.

I terreni liquidi, invece, soprattutto quando associati a sistemi automatizzati basati sulla fluorescenza, permettono di ridurre notevolmente i tempi di rilevazione della crescita. In media, la positività può essere evidenziata dopo circa **12 giorni**. Tuttavia, nonostante l'elevata sensibilità, **per poter refertare una negatività definitiva è necessario attendere 42 giorni, cioè 6 settimane**, poiché la crescita potrebbe essere estremamente lenta.

I terreni liquidi utilizzati per la coltura dei micobatteri sono terreni sintetici, generalmente a base di acido oleico e albumina, che forniscono i nutrienti necessari al metabolismo lipidico del micobatterio.



Esistono due principali sistemi per rilevare la crescita nei terreni liquidi:

- un **metodo radiometrico**, oggi praticamente non più utilizzato;
- un **metodo fluorimetrico**, che rappresenta attualmente lo standard → nel metodo fluorimetrico si utilizza uno strumento automatizzato dotato di cassette, all'interno dei quali vengono inseriti i flaconi inoculati con i campioni clinici dei pazienti. **Lo strumento funziona contemporaneamente come incubatore e come sistema di monitoraggio**, effettuando in modo automatico una lettura della crescita ogni ora. Sul fondo di ciascun flacone è presente un composto sensibile alla concentrazione di ossigeno. **Quando l'ossigeno diminuisce, il composto emette fluorescenza, che viene rilevata dallo strumento**. Poiché l'ossigeno viene consumato dai batteri durante la crescita, la riduzione dell'ossigeno è considerata un indice indiretto di crescita batterica.

Il grande vantaggio del terreno liquido è quindi quello di essere un sistema **completamente automatizzato**: il flacone viene inoculato, inserito nello strumento, e da quel momento la crescita viene incubata e monitorata senza ulteriori interventi manuali.

Nonostante i numerosi vantaggi dei terreni liquidi, **i terreni solidi vengono sempre utilizzati in parallelo**. Questo **perché risultano più selettivi rispetto ai terreni liquidi e permettono un migliore isolamento dei micobatteri in caso di contaminazione del terreno liquido**. I terreni solidi fungono quindi da terreno di controllo. Tra questi, il più utilizzato è il terreno di **Lowenstein-Jensen**, sul quale *Mycobacterium tuberculosis* forma colonie tipiche, chiare, rugose e con **aspetto a cavolfiore**.

Il terreno solido presenta diversi vantaggi rilevanti. È specifico per i micobatteri, economico e semplice da utilizzare. Inoltre, consente **l'osservazione diretta delle colonie, permettendo di distinguere, in prima battuta, se si tratti di un micobatterio tubercolare o di un micobatterio non tubercolare**.

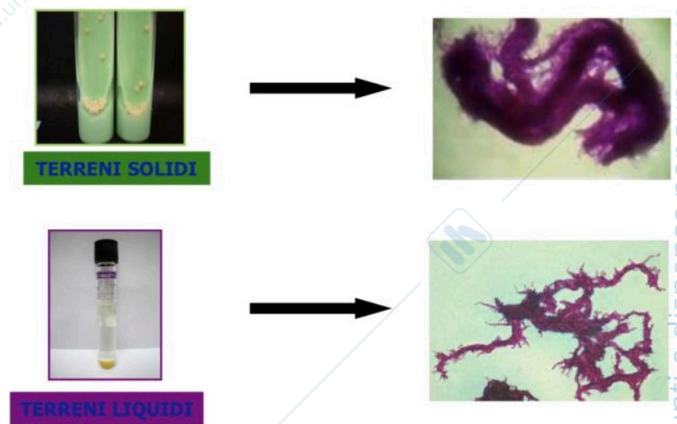
Un ulteriore vantaggio importante è la possibilità di incubare il terreno a temperature diverse. **I terreni liquidi, infatti, vengono incubati standardmente a 37 °C, ma non tutti i micobatteri crescono a questa temperatura**. Un esempio classico è *Mycobacterium marinum*, che può infettare l'uomo e cresce meglio a 30 °C. Per questo motivo, in presenza di un sospetto di lesione cutanea, il campione viene incubato anche a 30 °C, per consentirne l'eventuale isolamento.

Conferma della positività di un terreno liquido

Quando un terreno liquido risulta positivo, la riduzione di ossigeno indica la presenza di una crescita batterica, ma non garantisce che si tratti di micobatteri. È quindi necessario **confermare il risultato**.

La modalità più rapida per farlo è eseguire un **esame microscopico diretto** sulla coltura, utilizzando colorazioni specifiche per verificare la presenza di bacilli alcol-acido resistenti.

In particolare, ***Mycobacterium tuberculosis*, quando cresce in terreno liquido, tende a formare cordoni** caratteristici, dovuti alla presenza del **fattore cordale**, un **acido micolico di parete** che rappresenta anche un importante fattore di virulenza. Questi cordoni sono ben visibili al microscopio nelle colture liquide, mentre risultano molto meno evidenti su terreno solido.



Identificazione della specie micobatterica

L'osservazione dei cordoni, tuttavia, non è sufficiente per una diagnosi definitiva. È sempre necessario procedere all'identificazione precisa della specie micobatterica. Questo avviene **mediante un approccio molecolare**, basato su tecniche genetiche che sfruttano la presenza di **sequenze genomiche specie-specifiche**. Queste sequenze permettono di distinguere in modo accurato le diverse specie di micobatteri.

Il metodo più utilizzato prevede l'impiego di sonde di DNA complementari a tali sequenze note. Il legame tra la sonda e la sequenza bersaglio consente l'identificazione della specie, con tempi di risposta generalmente rapidi, nell'ordine di 1-2 giorni.

L'**amplificazione genica** comprende **una serie di test molecolari che permettono di ottenere un risultato in poche ore**, spesso nello stesso giorno in cui il campione arriva in laboratorio. Per questo motivo rappresentano un supporto fondamentale all'esame colturale, soprattutto per la rapidità della risposta.

Questi test vengono **utilizzati in particolare per microrganismi che:**

- **crescono lentamente,**
- **non sono coltivabili,**
- **oppure sono pericolosi da coltivare.**

Mycobacterium tuberculosis rientra perfettamente in questa categoria, poiché la sua lenta crescita rende la diagnosi colturale molto lunga. L'amplificazione genica consente quindi di ridurre drasticamente i tempi diagnostici e di aumentare la sensibilità.

Tuttavia, questi test non sostituiscono il test di riferimento, che rimane l'isolamento colturale.

Uno dei sistemi di amplificazione genica più utilizzati è il GeneXpert, che ha il grande vantaggio di permettere contemporaneamente:

- la **rilevazione di *Mycobacterium tuberculosis***;
 - l'**identificazione della resistenza alla rifampicina**, uno dei farmaci cardine della terapia antitubercolare.
- L'operatore inocula il campione all'interno di una cartuccia monouso, che viene inserita nello strumento. Il sistema esegue automaticamente una PCR real-time e **fornisce il risultato senza intervento manuale**. All'interno della cartuccia sono presenti compartimenti distinti per:
- l'estrazione del DNA,
 - l'amplificazione,
 - la rilevazione del segnale.

Vengono utilizzate sequenze che consentono di individuare mutazioni puntiformi responsabili di farmacoresistenza. Nel caso della rifampicina, le mutazioni sono concentrate in brevi regioni del genoma, rendendo l'analisi relativamente semplice. Per l'isoniazide, invece, l'identificazione della resistenza è più complessa, poiché coinvolge più geni.

Vantaggi e limiti dell'amplificazione genica

I test molecolari consentono di diagnosticare la presenza del bacillo tubercolare in poche ore e sono altamente specifici. **Rispetto all'esame batterioscopico sono molto più sensibili, ma anche molto più costosi.** Per questo motivo l'esecuzione deve essere selezionata dal clinico in base al sospetto diagnostico.

Tra i **limiti** principali vi è il fatto che **non distinguono tra batteri vivi e morti**, poiché rilevano frammenti di genoma. Inoltre, **rispetto all'isolamento colturale, presentano una sensibilità inferiore.**

Il test disponibile in commercio è validato per campioni respiratori. Studi successivi hanno dimostrato una buona attendibilità anche per campioni extrapulmonari, ma non è ancora presente una certificazione ufficiale.

I **test molecolari** permettono di affermare con certezza se si tratta di tubercolosi, ma **possono dare falsi positivi** dovuti a contaminazioni o alla presenza di micobatteri non vitali.

I **falsi negativi** possono essere dovuti a diversi fattori:

- presenza di **sostanze inibenti della polimerasi** (per questo i campioni di sangue non sono idonei);
- **eliminazione intermittente dei bacilli**, motivo per cui si richiede il prelievo di tre campioni in tre giorni consecutivi.

Ricapitolazione dell'iter diagnostico

In sintesi, l'iter diagnostico microbiologico della tubercolosi prevede:

- Arrivo del campione in laboratorio e processamento con decontaminazione.
- Esame microscopico diretto e isolamento colturale.
- In caso di positività, identificazione della specie e antibiogramma.
- Eventuale amplificazione genica, che fornisce una risposta rapida.

L'esame microscopico è utile perché, oltre a essere economico e rapido, consente di rilevare anche micobatteri diversi da *M. tuberculosis*. Il test molecolare, invece, è specifico per il bacillo tubercolare, ma non rileva altri micobatteri.

ANTIBIOGRAMMA NELLA TUBERCOLOSI

L'antibiogramma riveste un ruolo fondamentale nella gestione clinica della tubercolosi, poiché **consente di confermare o correggere la terapia antibiotica che il clinico ha già iniziato.** In presenza di un **sospetto clinico** di tubercolosi, infatti, la **terapia viene avviata immediatamente, senza attendere i risultati dell'antibiogramma, poiché i tempi necessari per un antibiogramma fenotipico, basato sulla crescita del batterio, sono molto lunghi e possono richiedere giorni o addirittura mesi.**

Principio su cui si basa l'antibiogramma

L'antibiogramma per *Mycobacterium tuberculosis* è concettualmente **diverso da quello utilizzato per la maggior parte degli altri batteri.** Questo **perché la resistenza ai farmaci antitubercolari è associata a mutazioni puntiformi spontanee che compaiono nel genoma batterico, e non a meccanismi di acquisizione di geni di resistenza tramite plasmidi.**

Per l'isoniazide, le mutazioni di resistenza compaiono mediamente ogni 10^5 generazioni, mentre per la rifampicina compaiono ogni 10^6 generazioni. Questo spiega perché la terapia antitubercolare viene sempre effettuata con più farmaci somministrati contemporaneamente: è **estremamente improbabile che uno stesso ceppo sviluppi simultaneamente mutazioni di resistenza verso più antibiotici.**

Correlazione tra resistenza e risposta clinica

È stato dimostrato che esiste una stretta correlazione tra la percentuale di ceppi resistenti presenti in una popolazione micobatterica e la risposta clinica alla terapia antibiotica.

In particolare:

- **se la percentuale di micobatteri resistenti a un determinato farmaco è inferiore all'1%, il farmaco risulterà clinicamente efficace;**
- **se la percentuale di micobatteri resistenti è superiore all'1%, la terapia con quel farmaco fallirà.**

Lo scopo principale dell'antibiogramma è quindi quello di determinare la proporzione di ceppi resistenti all'interno della popolazione batterica isolata dal paziente.

Metodo proporzionale su terreno solido

Il metodo teoricamente ideale per eseguire l'antibiogramma è il **metodo proporzionale su terreno solido.** In questo approccio:

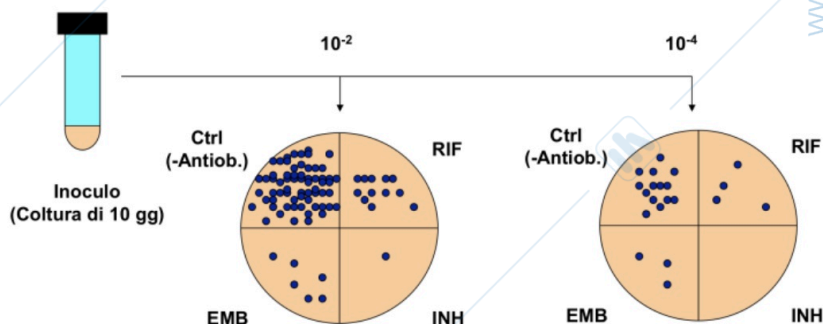
Si prepara una sospensione batterica che viene seminata su un terreno solido suddiviso in compartimenti.

Alcuni compartimenti contengono l'antibiotico in esame, mentre altri ne sono privi. **Dopo l'incubazione, si contano le colonie cresciute in presenza dell'antibiotico, che rappresentano i ceppi resistenti.**

Questo numero viene **confrontato con quello delle colonie cresciute nel compartimento senza antibiotico**, dove sono presenti sia ceppi sensibili sia resistenti.

In questo modo **si ottiene la proporzione di mutanti resistenti sul totale della popolazione e si può stabilire se la popolazione batterica sia suscettibile o resistente a quel farmaco.**

Tuttavia, questo metodo non viene utilizzato nella pratica routinaria, poiché i tempi richiesti per la crescita su terreno solido sono molto lunghi: **sono necessarie almeno 3 settimane** per osservare la formazione delle colonie.



Metodo proporzionale su terreno liquido

Per **ridurre i tempi** dell'antibiogramma, il metodo proporzionale viene applicato ai terreni liquidi, che permettono una **crescita molto più rapida dei micobatteri**. Utilizzando il terreno liquido, è possibile ottenere un risultato entro **circa una settimana**.

Per valutare se la proporzione di ceppi resistenti è inferiore o superiore all'1%, viene utilizzato un **controllo, costituito da una sospensione batterica diluita 1:100 e priva di antibiotici**.

Nel sistema di lettura automatizzata:

- una curva che non mostra crescita in presenza dell'antibiotico indica che il farmaco è efficace e che la popolazione è sensibile;
- una curva che mostra crescita precoce, addirittura più rapida rispetto al controllo, indica che la popolazione è resistente.

Questo tipo di grafico deriva da un antibiogramma in terreno liquido

adattato al metodo proporzionale, mirato a **stabilire se la proporzione di ceppi resistenti superi o meno la soglia dell'1%**.



Per l'esecuzione dell'antibiogramma in terreno liquido viene utilizzato il **sistema MGIT**, dotato di un software dedicato che **misura la crescita batterica e fornisce l'interpretazione automatizzata dei risultati**.

L'antibiogramma è fondamentale non solo per confermare la terapia in corso, ma anche per identificare precocemente un eventuale fallimento terapeutico. Inoltre, i dati ottenuti sono di grande importanza anche ai fini epidemiologici, per il monitoraggio della diffusione di ceppi resistenti. Il test deve essere eseguito su tutti e quattro i farmaci di prima scelta per ogni ceppo di Mycobacterium tuberculosis isolato in terreno liquido. In presenza di resistenze, è necessario estendere l'analisi ai farmaci di seconda scelta.

Antibiogrammi molecolari

Un aspetto particolarmente rilevante nella diagnostica moderna della tubercolosi è l'introduzione degli antibiogrammi molecolari, che consentono una **valutazione rapida della resistenza ai farmaci**.

Questi test sono applicabili al bacillo tubercolare perché **la resistenza è associata a mutazioni genetiche specifiche, che possono essere identificate tramite analisi molecolare**.

Gli antibiotici molecolari presentano diversi vantaggi:

- sono **rapidi**;
- possono essere eseguiti **direttamente sul campione clinico, senza attendere la crescita culturale**;
- permettono una **valutazione precoce della resistenza**.

Nonostante i vantaggi, gli antibiogrammi molecolari presentano importanti limiti. Hanno **costi elevati**, consentono di testare la resistenza solo verso un **numero limitato di farmaci e non permettono di individuare tutte le possibili mutazioni**, con una conseguente sensibilità inferiore.

Per alcuni farmaci il meccanismo di resistenza è relativamente semplice, come nel caso della rifampicina, per la quale le mutazioni sono concentrate in una breve regione del gene rpoB, che codifica per la subunità β dell'RNA polimerasi. In questo caso è sufficiente analizzare una porzione limitata del genoma.

Per altri farmaci, come l'**isoniazide**, la situazione è più complessa, poiché **le mutazioni di resistenza possono interessare più geni (almeno quattro)**. Di conseguenza, **l'antibiogramma molecolare può non individuare tutte le possibili resistenze, rendendo necessario un antibiogramma fenotipico di conferma**.

Esistono test commerciali in grado di rilevare le mutazioni associate alla resistenza a rifampicina e isoniazide, spesso basati su tecniche di ibridazione inversa. In queste metodiche vengono utilizzate sonde fissate su supporti di microcellulosa, ciascuna specifica per una determinata mutazione. Dopo l'amplificazione, l'analisi del profilo di bandeggio consente di identificare la presenza di mutazioni.

Considerazioni finali sulla tubercolosi

Nonostante Mycobacterium tuberculosis sia stato identificato già nel 1882, ad oggi la tubercolosi rimane una sfida sanitaria complessa. Gli strumenti diagnostici sono ancora limitati e migliorabili, i farmaci efficaci e approvati sono relativamente pochi, i marcatori diagnostici sono solo parzialmente disponibili e il vaccino attualmente in uso presenta un'efficacia variabile.

	HIV From 1981 ...41 years	TB From 1882 ...140 years	SARS-Cov-2 From 2020 ...1 year
Diagnosis	Kits available, rapid and accurate, in low income countries included	Need to be improved	Kits available, reasonable rapid and accurate, in low income countries included
Therapy	30 drugs approved	Less than 10 drugs approved	Less than 10 drugs approved
Biomarkers for treatment monitoring, cure and relapse	Available	Partly available	Partly available
Vaccine	Not available	Not available	Available

MYCOBACTERIUM LEPRAE

Mycobacterium leprae è l'agente eziologico della lebbra, identificato da Hansen nel 1800. È considerato un **microrganismo "a sé"**, cioè non viene inserito nel gruppo dei micobatteri atipici (micobatteri non tubercolari), ma **viene trattato come entità distinta**.

La lebbra è una malattia infettiva raramente letale, ma può essere fortemente invalidante, perché lascia disabilità importanti e danni permanenti, soprattutto a livello degli arti. Nonostante oggi sia poco frequente nei Paesi ad alto reddito, **la lebbra è ancora diffusa in alcuni Paesi in via di sviluppo: ogni anno si stimano oltre 200.000 nuovi casi**.

Caratteristiche biologiche e replicazione

La caratteristica più importante di M. leprae è che si tratta di un **batterio intracellulare obbligato**: questo significa che non è in grado di replicarsi al di fuori delle cellule dell'ospite. Questo lo distingue da Mycobacterium tuberculosis, che è invece un micobatterio intracellulare facoltativo, cioè può replicarsi all'interno delle cellule ma non è obbligato a farlo.

Proprio perché intracellulare obbligato, **M. leprae non è coltivabile in vitro**: non cresce su terreni di coltura, perché necessita dell'ambiente cellulare per replicarsi. **È però possibile propagare il batterio in vivo, in particolare nel cuscinetto plantare dell'armadillo**, un animale che può essere infettato e che viene sfruttato sperimentalmente.

I tempi di replicazione sono estremamente lunghi: **il batterio si duplica circa ogni 12 giorni, e questo rende l'infezione lenta e il trattamento terapeutico prolungato nel tempo**. Anche il **periodo di incubazione è molto lungo: mediamente è di circa 5 anni**, ma può arrivare fino a 20 anni.

Agente eziologico	Mycobacterium leprae (scoperto da Hansen nel 1800)
Inquadramento	Micobatterio "a sé" (non raggruppato tra i micobatteri non tubercolari/atipici)
Tipo di patogeno	Intracellulare obbligato (a differenza di M. tuberculosis che è intracellulare facoltativo)
Coltivabilità	Non coltivabile in vitro (non cresce su terreni); propagabile in vivo (es. nel cuscinetto plantare dell'armadillo)
Tempo di duplicazione	Molto lento: ~12 giorni
Incubazione	Media ~5 anni, possibile fino a ~20 anni
Cellule bersaglio	Macrofagi e cellule nervose / nervi periferici
Trasmissione	Via nasale o orale (contatto con secrezioni/mucose)
Tipo di malattia	Infezione granulomatosa cronica, lentamente progressiva

Cellule bersaglio e trasmissione

Le cellule bersaglio principali di M. leprae sono i **macrofagi e le cellule nervose**, in particolare quelle associate ai nervi periferici. Questo elemento è fondamentale perché spiega molte conseguenze cliniche, come la perdita di sensibilità e le complicanze invalidanti.

La **trasmissione può avvenire per via nasale o orale**, quindi attraverso mucose e secrezioni, soprattutto in contesti di esposizione prolungata.

Genoma e significato evolutivo

L'analisi genomica ha mostrato che M. leprae possiede un genoma più piccolo rispetto a quello di M. tuberculosis: è **circa il 75% del genoma del bacillo tubercolare**. Inoltre, una quota rilevante (**circa il 40%**) è **costituita da geni codificanti proteine**, indicando che una parte significativa del genoma non è più funzionale come in altri micobatteri.

Da questi dati si deduce che, **dal punto di vista evolutivo, M. leprae ha subito un decadimento genico, cioè la disattivazione e perdita funzionale di molti geni**. Questo processo **avrebbe contribuito alla sua lentezza replicativa e alla sua dipendenza dall'ambiente intracellulare, quindi al parassitismo obbligato**.

Malattia: caratteristiche generali e diverse forme

La lebbra è un'infezione granulomatosa cronica, lentamente progressiva, che colpisce soprattutto **cute e nervi periferici**. Tende a interessare in modo particolare le parti più fredde del corpo, come volto, naso, cute e tratto respiratorio superiore. È **raramente letale**, ma il danno ai nervi periferici porta a conseguenze molto importanti, soprattutto agli arti, rendendola una patologia altamente invalidante.

La lebbra presenta uno spettro clinico ampio, con **due estremi principali e numerose forme intermedie**.

- Da un lato c'è una **condizione paucibacillare**, in cui la **carica batterica è bassa** e l'ospite sviluppa una risposta immunitaria efficace, tale da mantenere l'andamento della malattia relativamente lieve. Questa forma è chiamata **lebbra tubercoloide** ed è caratterizzata da una **forte risposta cellulo-mediata** che limita la replicazione batterica.
- All'estremo opposto si trova una **forma multibacillare**, con **carica batterica molto elevata**. In questo caso la risposta cellulo-mediata è insufficiente; **prevale una risposta umorale, che è poco efficace perché il batterio è intracellulare e quindi non è facilmente accessibile agli anticorpi**. Questa forma è chiamata **lebbra lepromatosa**.
- Tra questi due estremi esistono numerose forme intermedie, con caratteristiche cliniche e immunologiche variabili.

Forma lepromatosa: gravità, contagiosità e conseguenze

La lebbra lepromatosa è la **forma più grave**. L'ospite presenta una **risposta cellulo-mediata molto scarsa, che non è in grado di controllare la replicazione del bacillo**. Si osservano lesioni a livello del **volto** e, poiché il bacillo infetta anche nervi periferici e cellule nervose, si verifica una **progressiva perdita di sensibilità agli arti**.

La perdita di sensibilità porta a **traumi ripetuti e lesioni non percepite**, con conseguenze fino ad arrivare ad amputazioni "naturali" nel tempo. Questa forma è anche **molto contagiosa, perché contiene una quantità elevata di bacilli**. Inoltre è fortemente invalidante e spesso difficile da controllare: **la terapia dura oltre due anni e in alcuni casi non riesce a ottenere un controllo completo dell'infezione**.

Forma tubercoloide: decorso e trattamento

Nella lebbra tubercoloide, al contrario, **l'ospite riesce a controllare la replicazione batterica tramite una risposta immunitaria cellulo-mediata efficace**. Il danno cutaneo è generalmente più modesto, la forma è **meno contagiosa e il trattamento può essere più breve**, anche di circa 6 mesi.

Diagnosi della lebbra

Per la lebbra non è disponibile un isolamento culturale, perché *M. leprae* **non è coltivabile**. La diagnosi viene quindi posta principalmente su **base clinica**, e può essere **supportata dalla ricerca microscopica dei bacilli in campioni prelevati dalle lesioni**.

Sono disponibili anche kit commerciali basati su **tecniche molecolari, che ricercano sequenze genomiche specifiche**, risultando più specifici per *M. leprae*.

MICOBATTERI NON TUBERCOLARI (MNT)

I micobatteri non tubercolari comprendono tutti i micobatteri che non appartengono al complesso tubercolare. **Vengono suddivisi in quattro gruppi in base a due criteri: produzione di pigmento e velocità di crescita**. Alcune specie hanno un chiaro significato clinico, mentre molte altre sono prevalentemente ambientali.

Tra le specie **più rilevanti dal punto di vista clinico** si ricordano: il complesso di ***Mycobacterium avium***, che è quello più frequentemente isolato nell'uomo e associato a infezioni (soprattutto polmonari nell'anziano e linfonodali nel bambino); ***Mycobacterium ulcerans***, responsabile dell'ulcera di Buruli; ***M. kansasii***; ***M. marinum***, che causa infezioni cutanee granulomatose in soggetti a contatto con acquari; e ***M. scrofulaceum***, associato a linfadenopatie.

I micobatteri non tubercolari **sono quasi 200 specie in grado di infettare animali e, nell'uomo, tipicamente provocano infezioni opportunistiche, cioè in soggetti predisposti o in particolari condizioni**. La maggior parte degli MNT non è patogena, ma alcune specie possono causare un ampio spettro di patologie.

Le patologie provocate dagli MNT nell'uomo vengono indicate complessivamente con il termine di **micobatteriosi**. Di solito sono infezioni polmonari, ma possono presentarsi anche con altre localizzazioni.

Diffusione ambientale e vie di esposizione

Esistono **circa 160–170 specie di MNT ubiquitari, ampiamente presenti nell'ambiente, soprattutto nelle acque**, incluse quelle delle reti idriche e degli acquedotti. Una via di esposizione sospetta è legata all'acqua dei rubinetti e a tutte le procedure che generano aerosol, come il soffione della doccia o le vasche idromassaggio: in questi contesti i micobatteri possono essere aerosolizzati e inalati.

In genere non esiste trasmissione diretta da individuo infetto a individuo sano, tranne in rari casi.

Micobatteri non tubercolari e infezioni polmonari

Tra gli MNT che causano infezioni polmonari si distinguono:

- **micobatteri a lenta crescita**, come ***M. avium* complex** e ***M. kansasii***;
- **micobatteri a rapida crescita**, come ***M. abscessus*** (associato a infezioni polmonari in pazienti con fibrosi cistica) e ***M. fortuitum***.

Sono considerati **patogeni emergenti** perché **si osserva un aumento dell'isolamento nell'uomo, in parallelo con l'aumento di popolazioni più suscettibili**: anziani con immunodepressione, pazienti trapiantati, aumento di terapie che favoriscono queste infezioni, pazienti in trattamento reumatologico (farmaci immunomodulanti) e pazienti oncologici.

Nel contesto locale vengono riportati dati relativi all'azienda ospedaliera pisana: nell'arco di 15 anni, oltre i tre quarti dei micobatteri isolati erano di origine respiratoria e si è osservato un **incremento progressivo degli MNT fino a raggiungere, e in alcuni periodi affiancare, i micobatteri tubercolari**; questo trend è considerato ancora attuale.



Diagnosi microbiologica degli MNT e significato clinico dell'isolamento

La diagnosi microbiologica degli MNT segue lo stesso percorso descritto per *M. tuberculosis*: il campione arriva in laboratorio, viene processato, si esegue l'**esame microscopico** (che evidenzia bacilli alcol-acido resistenti), si procede all'**isolamento culturale** e poi all'**identificazione della specie**, per stabilire se si tratta di micobatterio tubercolare o non tubercolare.

Per molti MNT vengono eseguiti antibiogrammi, anche se solo per alcuni farmaci e per alcune specie esistono opzioni realmente efficaci.

Poiché gli MNT sono diffusi nell'ambiente, possono rappresentare anche contaminanti. Per attribuire a un isolamento un reale significato clinico, soprattutto nelle patologie polmonari, devono essere rispettati criteri specifici che includono elementi radiologici, clinici e microbiologici.

Per i **criteri radiologici** è sufficiente la presenza di uno dei seguenti elementi: **una radiografia del torace con opacità nodulari o cavitarie, oppure una TAC ad alta risoluzione con bronchiectasie multifocali e/o piccoli noduli multipli**.

Per i **criteri clinici** sono necessari entrambi: **presenza di sintomatologia polmonare compatibile (pneumopatia cavitaria o non cavitaria, lesioni nodulari o bronchiectasie multifocali)** ed esclusione di altre possibili cause infettive.

Per i **criteri microbiologici** è sufficiente uno dei seguenti: **coltura positiva da almeno due campioni differenti di espettorato; coltura positiva da almeno un campione di broncoaspirato o BAL (lavaggio bronco-aveolare); biopsia transbronchiale o polmonare con reperti istopatologici patognomonic (granulomi e/o bacilli alcol-acido resistenti) e coltura positiva per MNT; oppure biopsia con reperti patognomonic associata a uno o più escreti o BAL positivi in coltura per MNT.**

Criteri per attribuire significato clinico a un isolamento di MNT (patologie polmonari)

Tipo di criterio	Requisiti
Criteri radiologici (ne basta uno)	<ul style="list-style-type: none">• RX torace con opacità nodulari o cavitarie• TAC ad alta risoluzione con bronchiectasie multifocali e/o piccoli noduli multipli
Criteri clinici (necessari entrambi)	<ul style="list-style-type: none">• Presenza di sintomatologia polmonare compatibile (pneumopatia cavitaria o non cavitaria, lesioni nodulari o bronchiectasie multifocali)• Esclusione di altre possibili cause infettive
Criteri microbiologici (ne basta uno)	<ul style="list-style-type: none">• Coltura positiva da almeno due campioni differenti di espettorato• Coltura positiva da almeno un campione di broncoaspirato o BAL• Biopsia transbronchiale o polmonare con reperti istopatologici patognomonic (granulomi e/o bacilli alcol-acido resistenti) e coltura positiva per MNT• Biopsia con reperti patognomonic associata a uno o più escreti o BAL positivi in coltura per MNT

MAC: Mycobacterium avium complex

Il Mycobacterium avium complex (MAC) è il gruppo più frequentemente isolato nell'uomo e comprende più specie. Le più importanti sono **M. avium, M. intracellulare e M. chimaera**. M. avium e M. intracellulare sono particolarmente diffusi nelle acque e sono responsabili soprattutto di infezioni polmonari.

Si distinguono **tre principali quadri clinici**:

- Il primo è la **sindrome tipica**: il paziente tipo è un uomo anziano con pneumopatia cronica. Si osservano tosse produttiva, dimagrimento, febbricola e sudorazioni notturne; radiologicamente possono comparire infiltrati, noduli e cavitazioni.
- Il secondo quadro è la **sindrome di Lady Windermere**: riguarda tipicamente donne senza altre patologie importanti, ma con anomalie strutturali della gabbia toracica. I sintomi includono tosse produttiva (la febbre compare soprattutto se la compromissione polmonare è diffusa). È descritta l'abitudine a sopprimere la tosse, con ristagno delle secrezioni; l'espettorato risulta frequentemente positivo all'esame microscopico.
- Il terzo quadro riguarda l'**infezione nei pazienti con fibrosi cistica**. In generale, le infezioni da M. intracellulare hanno una prognosi migliore rispetto a quelle da M. avium.

Linfoadenopatie da MAC

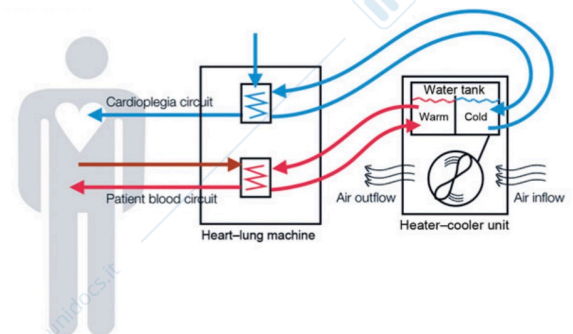
Il MAC può causare anche linfoadenopatie: in questo caso i **pazienti sono in età pediatrica**, mentre nell'adulto si tratta di una patologia rara. La trasmissione nei bambini avviene tipicamente per via orale, facilitata dall'abitudine di portare spesso le mani alla bocca. In questi casi è spesso necessario un trattamento chirurgico.

Outbreak da M. chimaera in cardiocirurgia

Alcuni anni fa si è verificato un outbreak da M. chimaera, specie appartenente al MAC. **Questo micobatterio è stato associato a infezioni polmonari soprattutto in anziani con patologie respiratorie croniche**, ma sono stati osservati **anche casi letali** in pazienti sottoposti a interventi cardiocirurgici con **circolazione extracorporea**.

Durante questi interventi viene utilizzato un apparato che regola la temperatura del sangue tramite un circuito d'acqua. In quell'episodio, **M. chimaera aveva colonizzato il circuito idrico dell'apparecchiatura, e i pazienti si sono infettati**. L'infezione ha provocato endocarditi letali comparse anche molti mesi dopo l'intervento.

Gli episodi sono stati limitati quando è stata identificata la ditta responsabile della commercializzazione di questi apparati e i dispositivi sono stati ritirati. Nella maggior parte dei casi descritti, dopo un periodo medio di 19 mesi comparivano **endocarditi o infezioni disseminate, con esito spesso letale**.



Patologie principali associate a MAC

Le patologie più frequenti correlate al MAC includono: **patologie polmonari** (soprattutto in anziani con malattie polmonari croniche), **linfadenopatie** nei bambini e **infezioni disseminate nei pazienti immunocompromessi**.

Mycobacterium ulcerans

Mycobacterium ulcerans è responsabile dell'**ulcera di Buruli**, considerata la terza più frequente malattia micobatterica in soggetti immunocompetenti dopo tubercolosi e lebbra. Provoca **lesioni cutanee prevalentemente nelle zone più fredde del corpo, perché non cresce a temperature superiori ai 33 °C**. Si replica lentamente (circa 10–14 giorni) ed è un micobatterio intracellulare facoltativo, capace quindi di moltiplicarsi sia a livello intracellulare sia extracellulare.

L'infezione è localizzata soprattutto in Africa occidentale ed è particolarmente importante nei bambini. La trasmissione avviene per contatto attraverso la cute; oltre ai soggetti infetti, **anche il suolo può rappresentare una sorgente di infezione**.

Un elemento peculiare è che **M. ulcerans produce una tossina: è l'unico micobatterio in grado di produrre una tossina che induce apoptosi cellulare, chiamata micolattone**.

Dal punto di vista clinico l'infezione determina ulcerazioni spesso molto estese, generalmente non dolenti, e la guarigione richiede spesso un trattamento chirurgico ricostruttivo.

