



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CLINICHE

CICLO XXXIV

COORDINATORE Prof. Lorenzo Cosmi

***Interazioni patogeno ospite e nanomedicina in pazienti italiani e immigrati***

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

**Dottorando**

Dott. Grassi Alessia

(firma)

**Tutore**

Prof. Mario Milco D'Elios

(firma)

**Coordinatore**

Prof. Lorenzo Cosmi

(firma)

Anni 2018/2021

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 I MICOBATTERI.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.....	4
1.1.2 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	6
1.1.3 <i>Mycobacterium non tuberculosis</i> .....	6
<b>1.2 PATOGENESI E IMMUNITÀ NELLE MICOBATTERIOSI DA NTM.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Fattori predisponenti dell'ospite e caratteristiche patogeniche dei microrganismi.....	8
1.2.2 Meccanismi di difesa dell'ospite.....	10
1.2.3 Citochine protagoniste .....	11
<b>1.3 DIAGNOSI.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Difficoltà diagnostiche.....	14
1.3.2 Diagnosi di infezione da <i>Mycobacterium avium</i> complex.....	16
1.3.3 Diagnosi di infezione da <i>Mycobacterium kansasii</i> .....	17
1.3.4 Diagnosi di infezione da <i>Mycobacterium xenopi</i> .....	17
1.3.5 Diagnosi di infezione da Micobatteri a crescita rapida.....	18
1.3.6 Diagnosi di linfadenite da NTM.....	18
1.3.7 Altre infezioni da NTM.....	19
<b>1.4 TRATTAMENTO.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Antibiotico-resistenza.....	20
<b>1.5 NANOTECNOLOGIE E NANOMEDICINA.....</b>	<b>22</b>
1.5.1 Le Nanotecnologie.....	22
1.5.2 Nanomedicina e antibiotico-resistenza.....	24
1.5.3 Nanoparticelle metalliche: agenti antibatterici.....	28
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA.....</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 CASISTICA.....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Casistica soggetti pediatrici.....	33
3.1.2 Casistica soggetti adulti.....	34

<b>3.2 ISOLAMENTO DI PBMCS DA SANGUE PERIFERICO.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 ANTIGENI BATTERICI.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 SAGGIO BRADFORD: QUANTIFICAZIONE DEI LISATI MICOBATTERICI.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5 TEST ELISpot.....</b>	<b>37</b>
<b>3.6 INDUZIONE DI LINEE LINFOCITARIE ANTIGENE SPECIFICHE.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7 VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITA' DELLE LINEE CELLULARI T OTTENUTE.....</b>	<b>38</b>
<b>3.8 NANOINGEGNERIZZAZIONE DELLE LINEE LINFOCITARIE T ANTIGENE SPECIFICHE E VALUTAZIONE DELL'UPTAKE E DELLA VITALITA' DELLE LINEE NANOINGEGNERIZZATE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.9 ANALISI STATISTICA.....</b>	<b>39</b>
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 RISULTATO TEST ELISPOT PAZIENTI PEDIATRICI.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 RISULTATO TEST ELISPOT PAZIENTI ADULTI.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 INDICE MITOGENICO DELLE LINEE <i>Micobacterium Avium</i> <i>Complex</i>-SPECIFICHE E PPD-SPECIFICHE.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4 VALUTAZIONE DELL'UPTAKE DELLE NP MAGNETICHE FLUORESCENTI DA PARTE DELLE LINEE- ANTIGENE-SPECIFICHE.....</b>	<b>51</b>
<b>4.5 VITALITA' DELLE LINEE LINFOCITARIE ANTIGENE- SPECIFICHE NANOINGEGNERIZZATE.....</b>	<b>54</b>
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>56</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>60</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I MICOBATTERI

Il genere *Mycobacterium*, appartenente alla famiglia delle *Mycobacteriaceae*, fu introdotto per la prima volta nella letteratura scientifica da Lehmann and Neumann nel 1896, appena 14 anni dopo che Robert Koch per primo isolò e descrisse il *Mycobacterium Tuberculosis* l'agente causale della tubercolosi, una malattia che sebbene fosse chiamata con nomi diversi era conosciuta nel mondo della medicina da secoli [1-3].

Oggi si conoscono più di 170 specie batteriche appartenenti a questo genere, le quali sono per la maggior parte rappresentate da patogeni opportunisti che vivono liberi nell'acqua e nel suolo come saprofiti ma vi sono anche patogeni obbligati e specie non patogene [4,5].

Questi batteri presentano una sottile forma a bastoncino, sono immobili, non formano spore, la maggior parte include microrganismi aerobi obbligati ma vi sono anche specie microaerofile e hanno un tempo di generazione piuttosto lungo (circa 20 h) il che significa che per l'isolamento e l'identificazione possono volerci fino a 6 settimane. La causa di questo lungo tempo di generazione risiede nella particolare parete cellulare composta da 4 strati in cui sono presenti peptidoglicani ed altri lipidi tra cui l'acido micolico. Questo rende il loro involucro idrofobico e gli dona una permeabilità altamente selettiva che provoca un rallentamento degli scambi metabolici, una resistenza ai metalli pesanti, ai disinfettanti, agli antibiotici e li rende relativamente impermeabili ai più comuni coloranti che utilizzano il fenolo o alcol per la decolorazione. Per questo vengono definiti Gram-variabili, poiché reagiscono in modo scarso alla colorazione di Gram [5-7].

Le colonie formate dai micobatteri possono essere lisce o rugose e possono assumere colorazioni che variano dal bianco fino all'arancione o al rosa [5].

Nel 1959 il botanico E. Runyon affermò che i micobatteri potevano essere separati in due gruppi principali, i micobatteri che causano tubercolosi (*M. tuberculosis* complex, MTC) e i micobatteri non tubercolari (NTM). Questi ultimi venivano a loro volta suddivisi in 4 gruppi in base alla velocità di crescita e alla cromogenia. Al I gruppo appartenevano le specie fotocromogene a crescita lenta, al II gruppo le specie scotocromogene e crescita lenta, al gruppo III specie non cromogene a crescita lenta e al gruppo IV specie a crescita rapida. Questa classificazione non è netta, in quanto, alcune specie possono appartenere a più gruppi contemporaneamente e conserva, ormai, solo un valore storico. Oggi gli NTM vengono suddivisi essenzialmente in micobatteri a crescita lenta (slowly growing mycobacteria, SGM) e micobatteri a crescita rapida (rapid growing mycobacteria, RGM). Un genere

fenotipicamente e geneticamente distinto dai micobatteri tubercolari e dagli NTM è costituito dal *Mycobacterium leprae* agente causale della leprosi [8,9].

<b>M. tuberculosis complex</b>	
M. tuberculosis	
M. bovis	
M. africanum	
<b>M. leprae</b>	
<b>Nontuberculous mycobacteria</b>	
Slowly growing mycobacteria	
M. kansasii	(Photochromogens, Runyon group I)
M. marinum	
M. goodii	(Scotochromogens, Runyon group II)
M. scrofulaceum	
M. avium complex	(Nonchromogens, Runyon group III)
M. avium	
M. intracellulare	
M. terrae complex	
M. ulcerans	
M. xenopi	
Rapidly growing mycobacteria (Runyon group IV)	
M. fortuitum	
M. chelonae	
M. abscessus	

**Tabella 1 [8]. Classificazione delle specie micobatteriche che comunemente causano malattie umane**

### 1.1.2 *Mycobacterium tuberculosis complex*

Il sottogenere MTC comprende *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti* e *M. canettii*. Sono parassiti intracellulari obbligati per l'uomo e/o per gli animali, ad eccezione di *M. bovis* BCG e *M. microti*, che causano solo malattie occasionali sono agenti eziologici della tubercolosi (TB), infezione batterica cronica caratterizzata dalla presenza di tubercoli nei tessuti infetti e da un'accentuata ipersensibilità cellulo-mediata [10]. La World Health Organization (WHO) produce un report annuale che fornisce un aggiornamento sulla situazione epidemica globale riguardante la TB. Fino al 2020, nel mondo, si era registrata una diminuzione sia del tasso di incidenza, sia del numero di morti dovute a questa patologia.

Nel 2019 i malati di TB nel mondo erano circa 10 milioni di persone (con un range da 8,9-11,0 milioni), di cui un 56% sono uomini, il 32% sono donne e un 12% bambini di età inferiore ai 15 anni. La TB colpisce soprattutto i paesi più poveri, in particolare le regioni dell'Africa, dell'Europa Orientale e del Sud-Est Asiatico [11]. I dati più recenti relativi

all'Italia sono pubblicati nel documento congiunto ECDC e OMS Europa "Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021 (2019 data)" e confermano che l'Italia rientra tra i Paesi a bassa incidenza di malattia (<20/100.000) con la concentrazione della maggior parte dei casi in alcuni gruppi a rischio [12].

Purtroppo la piccola diminuzione dei casi di TB registrata globalmente negli ultimi anni ha subito un arresto nell'anno 2020 quando si è avuta una diminuzione del 18% dei casi notificati accompagnata ad un aumento delle morti dovute a TB, fatto che non si registrava da almeno 9 anni. Questi fenomeni sono si sono verificati a causa della pandemia di COVID-19 che ha reso inaccessibili i servizi diagnostici e le cure per almeno la metà delle persone che si sono ammalate di TB dal 2020 ad oggi [13,14].

I batteri appartenenti al MTC sono patogeni intracellulari che sebbene si possano insediare in qualsiasi organo, si localizzano solitamente nei polmoni. In questi casi la forma iniziale di tubercolosi si evidenzia da sintomi molto comuni come tosse, calo ponderale, debolezza e sudorazione notturna, infatti in questa fase la tubercolosi è diagnosticabile solo mediante radiografia del torace. Poi nella malattia progressa si riscontrano emottisi, dispnea, febbre e dolore toracico. L'eliminazione batterica da parte del sistema immunitario dell'ospite dipende da molti fattori quali la carica infettante e la patogenicità della specie e lo stato di competenza del sistema immunitario dell'ospite. Il risultato dell'interazione ospite-patogeno, che si esplica con un'infezione intracellulare dei fagociti, può dunque tradursi in guarigione per completa eradicazione del batterio da parte dei macrofagi, in manifestazione di tubercolosi attiva, anche in forma miliare grave o in un fenomeno d'infezione latente, asintomatica ma cronica [15]. L'uomo è l'unico serbatoio naturale delle specie *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. canetti* ma altre specie possono trovarsi nel bestiame (es. *M. bovis*) o nel pesce (*M. pinnipedii*). La trasmissione avviene principalmente attraverso l'inalazione di droplets contaminate oppure, ad esempio nel caso di *M. bovis*, può essere trasmesso dal bestiame consumando carne cruda o latte non pastorizzato [16]. Gli individui ad alto rischio sono immunocompromessi, immigrati provenienti da paesi ad elevata endemia, alcol o droghe dipendenti, senzatetto e personale sanitario. La diagnosi viene condotta mediante un primo screening con TST (test cutaneo della tubercolina) o IGRA (interferon-gamma release assay) a cui seguono valutazioni cliniche, radiologiche e microbiologiche (microscopia a fluorescenza e isolamento da coltura cellulare o identificazione con sonde molecolari specie specifiche). I regimi terapeutici impiegati contro la tubercolosi sono numerosi ma i farmaci utilizzati più frequentemente sono Isoniazide, Pirazinamide, Etambutolo e Rifampicina [17]. Fortunatamente, nell'85% dei casi, la malattia

è curabile assumendo antibiotici per un periodo di tempo che può variare da 1 a 6 mesi, anche se, anche per questa, come per altre patologie batteriche, si fa sempre più importante la minaccia dell'antibiotico-resistenza [1, 13].

### **1.1.2 *Mycobacterium leprae***

È l'agente eziologico della lebbra (o malattia di Hansen) infezione cronica della pelle, dei nervi e delle membrane mucose, caratterizzata dalla presenza di ulcerazioni [1]. In base alla natura e alla gravità dei sintomi, nonché in base alle manifestazioni istopatologiche, la lebbra si può suddividere in 6 categorie (classificazione di Ridley–Jopling adottata anche in Italia) [18]. Vi sono due forme estreme: ad un polo la forma tubercoloide (TT), espressione di elevata reattività verso *M. leprae*, e all'estremo opposto la forma lepromatosa polare (LL) caratterizzata da completa anergia. Oltre alle due forme polari TT e LL vi sono tre forme intermedie "borderline": Borderline Tubercoloide (BT), Borderline Centrale (BB) e Borderline Lepromatosa (BL). Al di fuori dello spettro delle forme conclamate, gli autori pongono una forma iniziale a immunità incerta: la forma Indeterminata. Nel 95% dei soggetti che vengono a contatto con il micobatterio non si ha malattia, oppure si instaura una infezione sub-clinica che si risolve spontaneamente. In una minima percentuale della popolazione l'infezione sub-clinica evolve verso la malattia [18]. La trasmissione si verifica per l'inalazione di particelle infette o con il contatto di secrezioni respiratorie o essudato di ferite. In epidemiologia si contano pochi casi nei paesi sviluppati mentre è ancora frequente in India, Nepal e Brasile. Si tratta di un bacillo non coltivabile in vitro quindi la diagnosi avviene mediante test cutaneo, per la forma tubercoloide, o mediante microscopia sensibile, per la forma lepromatosa. La terapia prevede l'utilizzo di Rifampicina e Dapsone [1,19].

### **1.1.3 *Mycobacterium non tuberculosis***

I batteri appartenenti al sottogenere NTM vivono ubiquitariamente come saprofiti nell'ambiente. Questi microrganismi sono stati riscontrati nell'aria, si sono dimostrati capaci di aderire al suolo e a particelle di polvere, ne è stata riscontrata la presenza nelle acque degli estuari, nelle acque superficiali come laghi, fiumi e pozzanghere ma anche in pozzi e acque di sorgente, pertanto in fonti di acque potabili. Possono essere presenti su piante, animali selvatici, latte e fonti di cibo [20,21].

Presentano un particolare rivestimento formato da un sottile strato di peptidoglicano circondato da uno spesso rivestimento lipidico che li rende capaci di aderire alle superfici rugose e garantisce loro resistenza ai disinfettanti e agli antibiotici e li aiuta a sopravvivere in condizioni di carenza di ossigeno e di carbonio ed altre condizioni avverse [20].

Nel tempo hanno avuto diversi appellativi. Oltre che come NTM sono conosciuti come “micobatteri ambientali”, “micobatteri atipici”, “micobatteri anonimi” e “micobatteri altri rispetto al *Mycobacterium tuberculosis*” (MOTT) [20,22].

Mentre le patologie associate ai micobatteri tubercolari e a *M. Leprae* sono ampiamente conosciute da tempi antichi, il potenziale patogenico degli NTM è stato riconosciuto solo a metà del XX secolo [22].

Le infezioni da NTM sono in crescita in tutto il mondo. Negli ultimi anni si è assistito ad un aumento in Nord America ed Europa, mentre la loro diffusione era già stata dimostrata in aree ad alta endemia tubercoloide (Africa, Sud America ed India) [23]. Per le infezioni da NTM non è possibile fare un report globale così come viene fatto per le infezioni da *M. tuberculosis* in quanto in molti Paesi le patologie associate non vengono notificate ai servizi di salute pubblica ed in molte regioni dei Paesi in via di sviluppo molto spesso le infezioni da NTM vengono scambiate per casi di TB antibiotico-resistente [22].

Le patologie associate alle infezioni da NTM possono avere varie manifestazioni e vengono generalmente denominate “micobatteriosi” [22]. Le specie di NTM maggiormente associate a patologia nell’uomo sono *M. abscessus* complex, *M. kansasii* e *M. avium* complex (MAC). MAC è stato incluso nel gruppo dei maggiori patogeni umani insieme a *M. tuberculosis*. Le due specie principali appartenenti al MAC sono *M. avium* e *M. intracellulare* [24]. *M. avium* fu isolato per la prima volta nel 1890 da un pollo che presentava una patologia cavitaria simile alla tubercolosi; nell’uomo il primo caso di micobatteriosi da *M. avium* fu identificato nel 1930 [24].

L’American Thoracic Society (ATS) considera quattro manifestazioni cliniche distinte per le micobatteriosi da NTM tra cui una malattia polmonare cronica, una malattia disseminata, una patologia cutanea e linfadenopatia, anche se la patologia cronica a livello polmonare rimane la più rappresentativa nei soggetti adulti [25].

Nei bambini, invece, in associazione alle infezioni da NTM, si verifica più frequentemente la linfadenopatia la quale si riscontra nel 38-45% dei bambini in salute ogni anno [26-28]. Le specie appartenenti al MAC sono gli agenti causali di più del 75% dei casi di linfadeniti cervicali associate a NTM nei bambini [29,30], mentre negli adulti si stima che le infezioni da MAC siano per l’85% a carico dei polmoni [31]. La linfadenopatia associata a infezione

da MAC solitamente colpisce i bambini di età inferiore ai 4 anni ed è caratterizzata da masse nel collo unilaterali e prive di dolore. Il decorso clinico è imprevedibile e varia dalla regressione spontanea alla fistolizzazione [32,33].

Nonostante questi microrganismi siano ubiquitari nell'ambiente e pertanto il contatto con essi sia piuttosto inevitabile, le infezioni da NTM avvengono raramente poiché le difese dell'ospite di solito sono in grado di prevenire l'insorgenza della malattia. I pazienti che sviluppano micobatteriosi da NTM hanno fattori predisponenti che li rendono particolarmente vulnerabili in caso di esposizione a questi microrganismi [25], in particolare si sviluppano in persone che presentano patologie polmonari croniche di fondo come la broncopneumopatia cronico-ostruttiva (BPCO), bronchiectasie, fibrosi cistica o situazioni di immunocompromissione come ad esempio nei soggetti affetti da infezione da HIV [34,35] o in cura con trattamenti immunosoppressivi. Altri fattori predisponenti possono essere la malattia da reflusso gastro-esofageo, carenza di vitamina D, artrite reumatoide o basso indice di massa corporea. Ovviamente ciò non toglie che si possano avere infezioni anche in soggetti immunocompetenti [36]. Nei pazienti affetti da virus HIV e nei soggetti immunosoppressi il microrganismo maggiormente riscontrato è *M. avium*, mentre il 40% delle infezioni polmonari nei pazienti immunocompetenti è dovuta a *M. intracellulare* [37]. Il contagio avviene quando l'essere umano o l'animale attinge al serbatoio, rari sono i contagi da cibo contaminato ed escludibili i casi di contagio interumano. Ancora oggi però i meccanismi di trasmissione non sono totalmente conosciuti si parla infatti di infezioni sporadiche che nella maggior parte dei casi sono opportunistiche. In aggiunta esistono casi di linfadeniti infantili in cui la via d'ingresso del patogeno è la cavità orale, oppure infezioni superficiali in cui si ha l'inoculazione diretta, traumatica o iatrogena del micobatterio [35,38].

## **1.2 PATOGENESI E IMMUNITÀ NELLE MICOBATTERIOSI DA NTM**

### **1.2.1 Fattori predisponenti dell'ospite e caratteristiche patogeniche dei microrganismi**

Nonostante la presenza ubiquitaria delle specie NTM nell'ambiente e quindi la presumibile continua esposizione umana a questi patogeni, i casi di patologie NTM-correlate sono relativamente infrequenti. Questa discrepanza suggerisce che questi microrganismi posseggano un potenziale patogenico basso o moderato e che i fattori di rischio dell'ospite giochino un ruolo fondamentale nella vulnerabilità alle infezioni [39]. Anche se gli studi

focalizzati sulla patogenesi non hanno ancora chiarito le condizioni che permettono l'instaurarsi della malattia, lo sviluppo e la progressione delle infezioni da NTM sono favorite dall'esposizione ambientale, da fattori predisponenti dell'ospite e da fattori propri del microrganismo ed acquistano un particolare rilievo la dose infettante, la durata della colonizzazione e le alterazioni del sistema immunitario (locali o sistemiche, temporali o permanenti) [39,40].

Fattori immunosoppressivi, come trattamenti con corticosteroidi, anomalie croniche-renali, HIV, diabete mellito, favoriscono l'insorgenza della micobatteriosi da NTM. Oltre ciò patologie respiratorie croniche e alterazioni genetiche che interessano l'immunità cellulo-mediata, giocano un ruolo predisponente, ad esempio anomalie nella sintesi di interleuchina-12 (IL-12) e dell'interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ) o dei loro recettori. L'IL-12 viene secreta dalle cellule presentanti l'antigene (APC) dopo il contatto con il patogeno intracellulare ed è composta da 2 subunità, p40 e p35, che compongono insieme la citochina biologicamente attiva. I recettori per IL-12 sono espressi sulle cellule natural killer (NK) e sui linfociti T, dove, tra le tante funzioni, stimolano la produzione dell'IFN- $\gamma$  [34-36,41].

I micobatteri sono circondati da un sottile strato di peptidoglicano che protegge la membrana cellulare. Uno strato di arabinogalattano con un profondo strato di acidi grassi beta-idrossilati a catena lunga, chiamato acido micolico, protegge i micobatteri dal danno chimico, antibiotici e disidratazione. L'acido micolico è impacchettato con una varietà di glicolipidi (GPLs) che vengono esposti sulla superficie. I glicolipidi che si trovano sulla superficie dei microrganismi appartenenti al MAC sono diversi da quelli che si trovano su *M. tuberculosis* e sono responsabili delle loro caratteristiche morfologiche e delle loro proprietà immunomodulanti [24,25]. Una volta entrati nell'ospite MAC creano un biofilm all'interno del quale i batteri subiscono dei cambiamenti dello stato fenotipico formando una comunità eterodinamica che crea una matrice extracellulare che conferisce ulteriore resistenza agli ambienti avversi [42].

I fattori di virulenza del MAC non sono pienamente conosciuti, ad ogni modo, una volta oltrepassato il cavo orale, i batteri interagiscono con la mucosa gastrointestinale: studi *in vitro* confermano che i MAC sono capaci di legarsi agli enterociti. Questo legame potrebbe essere facilitato dalla presenza di proteine di adesione sulla superficie batterica [36]. Una volta oltrepassate le barriere meccaniche, i micobatteri vengono riconosciuti e fagocitati dai neutrofili e dai macrofagi, i quali tentano di uccidere i batteri al loro interno con l'ossido nitrico e i radicali liberi [37, 43]. Questo provoca una risposta intracellulare che porta al rilascio di citochine e chemochine responsabili, a loro volta, di una ulteriore attivazione delle

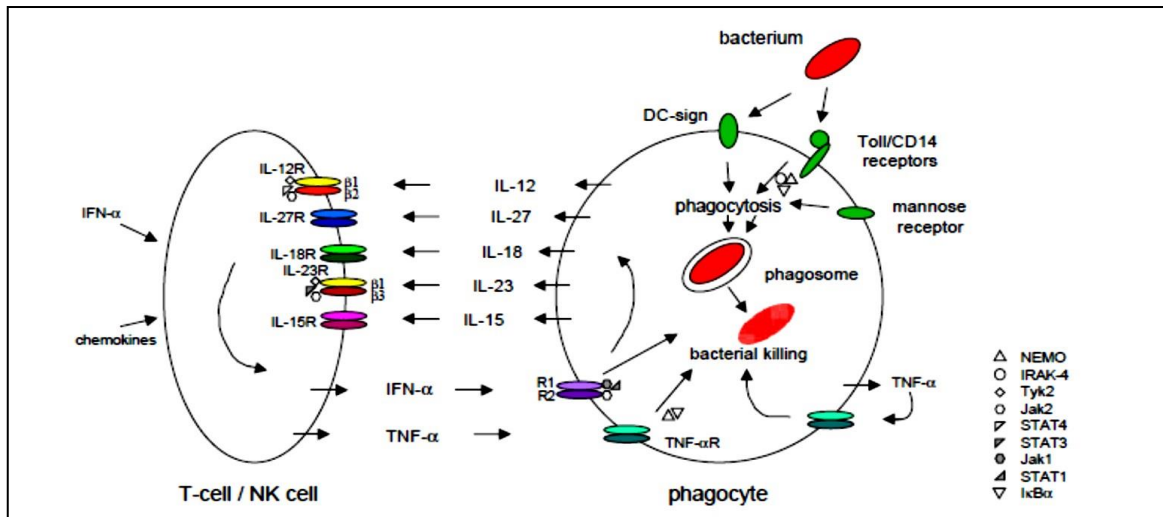
risposte immunitarie dell'ospite e della chemiotassi di altre cellule immuni. I microrganismi fagocitati mettono in gioco vari meccanismi di difesa per sopravvivere alle condizioni avverse all'interno dei fagociti: producono agenti che inibiscono i meccanismi associati con lo stress ossidativo (es. superossido-dismutasi o heat shock proteins) o inibiscono la fusione tra fagosomi e lisosomi [36].

### **1.2.2 Meccanismi di difesa dell'ospite**

Il riconoscimento del MAC da parte dei macrofagi avviene principalmente tramite il toll-like receptor 2 (TLR2) portando alla produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e chemochine come il C-X-C motif chemokine 10 (CXCL-10). Le chemochine e il TNF $\alpha$  provocano la chemotassi delle cellule infiammatorie quali linfociti, altri macrofagi e cellule dendritiche nel sito di infiammazione. I macrofagi attivati, insieme al micobatterio fagocitato ed ancora in vita, si dirigono verso i linfonodi dove avviene la presentazione dell'antigene alle cellule T helper attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (MHC II). Questo porta all'attivazione delle risposte specifiche nell'ospite [36]. Gli antigeni batterici attivano anche le cellule Natural Killer (NK) inducendo l'espressione di ligandi attivatori sulle cellule infettate e stimolando la produzione di IL-12 e interleuchina 15 (IL-15) da parte delle cellule dendritiche e dei macrofagi. Queste citochine promuovono la sintesi, nelle cellule NK, di IFN- $\gamma$  che a sua volta permette la formazione di sostanze microbicide da parte dei macrofagi [44].

L'immunità innata può limitare solo temporaneamente la crescita batterica, infatti non sopprime i micobatteri. Una caratteristica fondamentale dei batteri intracellulari è la loro capacità di sopravvivere e replicarsi all'interno dei fagociti ed eludere, di conseguenza, la risposta umorale. La loro eliminazione dipende esclusivamente dall'immunità cellulare quindi dalle risposte specifiche dell'ospite; i suoi rappresentanti sono i linfociti T, che dispongono di due strategie finalizzate alla distruzione dei batteri:

- La produzione di IL-12 porta all'attivazione dei linfociti T CD4<sup>+</sup> di tipo 1 (Linfociti T helper 1 o Th1) specifici che esprimono il CD40-ligando e producono IFN- $\gamma$  favorendo così la sintesi di sostanze tossiche da parte dei macrofagi.
- L'attivazione dei linfociti citotossici T CD8<sup>+</sup> (CTL) specifici, che uccidono le cellule bersaglio infettate tramite l'esocitosi di granuli contenenti perforina e granzimi. La perforina facilita l'ingresso dei granzimi nel citoplasma, questi avviano numerose vie pro-apoptotiche [43].



**Figura 1 [44]. Risposta immune contro i micobatteri (in rosso). Si distinguono il meccanismo di riconoscimento dell'epitopo antigenico da parte dei TLR (in verde) nei macrofagi e le citochine rilasciate dal fagocita per l'attivazione delle cellule NK e T.**

In più, i micobatteri, attraverso il legame al cluster of differentiation 1 (CD1), possono essere riconosciuti anche dai linfociti  $T\gamma\delta$  che sono estremamente reattivi nei confronti dei micobatteri e sono capaci di ucciderli [36].

La risposta immune si sviluppa per 4-6 settimane dopo l'infezione. Il batterio può smettere di moltiplicarsi e può rimanere intrappolato, quindi isolato, nel granuloma che si forma come risultato della risposta immune. Questo granuloma fornisce al batterio una nicchia in cui può sopravvivere a lungo come organismo intracellulare. Il granuloma consiste principalmente di macrofagi di derivazione sanguigna, cellule epiteliali e cellule giganti multinucleate (cellule di Langhans), circondate da linfociti T e fibroblasti. Il centro del granuloma può presentare necrosi caseosa dovuta a morte cellulare [36,37].

### 1.2.3 Citochine protagoniste

Tra le citochine maggiormente coinvolte nella risposta contro i micobatteri hanno particolare rilievo l' IFN- $\gamma$ , l' interleuchina 2 (IL-2) e l' interleuchina 17 (IL-17).

IFN- $\gamma$  è una proteina necessaria per l'attivazione dei macrofagi e svolge importanti funzioni nella risposta immunitaria contro i microrganismi intracellulari. È espressa dai linfociti Th1, dalle cellule NK e dai linfociti T citotossici. Il recettore per IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) è presente sulla superficie di molte cellule del sistema immunitario: è composto da due catene polipeptidiche che dimerizzano dopo il contatto col ligando e si ha l'attivazione della via del segnale Janus-kinase (JAK)-STAT che, tramite fosforilazione del fattore trascrizionale STAT1 da parte delle chinasi JAK1 e JAK2, porta all'attivazione di geni che stimolano sia la risposta

immunitaria innata che adattativa. L'IFN- $\gamma$  potenzia dunque l'attivazione fagocitaria per l'eliminazione dei microrganismi e promuove la risposta cellulare inducendo la sintesi di citochine pro-infiammatorie, come il TNF- $\alpha$ . L'IFN- $\gamma$  inibisce la produzione di citochine come l'IL-4 che portano alla differenziazione delle cellule Th2, coinvolte nelle risposte umorali, favorendo la polarizzazione delle cellule T CD4<sup>+</sup> naive verso un fenotipo T helper di tipo 1, essenziale per l'attivazione del fagocita e quindi dell'uccisione del patogeno intracellulare. Al fine di potenziare la risposta immune contro il patogeno, inoltre, IFN- $\gamma$  stimola l'upregolazione di molecole MHC-I e MHC-II e di molecole costimolatorie da parte delle APC e la produzione di anticorpi IgG da parte dei linfociti B. Mutazioni in topi knock-out per il gene codificante IFN- $\gamma$  o i suoi recettori, aumentano la suscettibilità ad infezioni come la micobatteriosi non tubercolare [43, 45-47]

L' IL-2 è un importante peptide immunoregolatore con un ruolo centrale nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule T. Essa ha infatti un'azione autocrina, sulle stesse cellule che la rilasciano, e paracrina, nelle popolazioni cellulari circostanti. Si tratta di una proteina rapida e transitoria, prodotta dopo 1-2 ore dall'ingresso dell'antigene e smaltita entro le 24 ore. La cinetica del rilascio di IL-2 è comparabile a quella dell'IFN- $\gamma$ , sebbene la forza della risposta sia minore [48].

I recettori sono espressi in maniera transitoria nei linfociti T naive ed effettori, mentre sono costitutivi sui linfociti T regolatori. È secreta prevalentemente dalle cellule T attivate ma anche dalle NK e dalle cellule dendritiche dopo il riconoscimento antigenico e il contatto con molecole costimolatorie. Il legame dell'antigene al TCR (T cell receptor) ed altri segnali costimolatori promuovono la secrezione di IL-2 e l'espressione della catena  $\alpha$  (CD25) del relativo recettore che, una volta attivato, innesca la pathway JAK/STAT in modo da indurre crescita, proliferazione, differenziamento dei T effettori e T della memoria [49]. Il recettore, quando si trova nella forma attiva, è un complesso trimetrico 2R $\alpha\beta\gamma$  in grado di legare con maggiore affinità IL-2. Oltre ciò, risulta di estrema importanza per la sopravvivenza e il funzionamento dei linfociti T regolatori, fondamentali per la soppressione della risposta immunitaria contro gli antigeni self. Infatti, in esperimenti con topi knock-out per il gene di IL-2 o i suoi recettori, si documenta uno sviluppo di malattie autoimmune [43,50]. Pazienti con la immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (sindrome IPEX), in cui sono presenti mutazioni nei geni che codificano per la catena  $\alpha$  del recettore per IL-2 mostrano un'aumentata suscettibilità alle infezioni virali, batteriche e fungine [51]. Nuovi studi in vitro ipotizzano anche un suo coinvolgimento proliferativo nelle cellule NK e linfociti B [43, 50].

L'importanza della citochina IL-2 nella memoria delle infezioni da *M. tuberculosis* è stata dimostrata in studi che la propongono come utile mezzo per la diagnosi della fase di tubercolosi latente sia nel bambino che nell'adulto [52, 53].

Nelle infezioni da MTB si osserva aumento del subset di cellule dendritiche CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>, che promuovono l'induzione di linfociti con profilo Th17 [54,55].

IL-17 è la principale citochina secreta dalle cellule Th17, sottopopolazione che si differenzia a partire dai linfociti CD4<sup>+</sup> in seguito a stimolazione mediata da citochine come IL-23, IL-1 e IL-6 e controllata dal fattore trascrizionale ROR $\gamma$ t [56]. Le funzioni primarie prevedono la promozione dell'infiammazione caratterizzata da una forte componente neutrofila e la produzione di sostanze antimicrobiche da parte dei fagociti. Studi dimostrano l'aumento della concentrazione di questa citochina in pazienti con infezioni da MTB e NTM. Perciò si può quantomeno affermare, che i linfociti Th17 inducono l'infiammazione mediata dai neutrofili contro batteri e funghi e sono coinvolti, insieme ai linfociti Th1, nell'eliminazione dei microbi da parte dei fagociti nell'immunità cellulo-mediata [43].

Nonostante le cellule Th17 abbiano un'importante ruolo nella difesa contro patogeni opportunisti, fungini o di origine batterica, presentano anche un ruolo patogenico, che è stato chiaramente documentato, in molti disordini infiammatori [57].

L'IL-17 e le risposte immunitarie ad essa associate sono anche correlate al danno polmonare causato da infiammazione aberrante in varie patologie polmonari come nella BPCO e nella fibrosi cistica. L'IL-17 promuove una risposta esagerata nelle cellule epiteliali respiratorie e promuove la secrezione della  $\alpha$ -actina nelle cellule muscolari lisce e la produzione di fattori pro-fibrotici. Oltre che dai linfociti Th17, l'IL-17 può essere prodotta dai linfociti T  $\gamma\delta$ , dalle cellule NK invariati e dalle cellule linfoidi innate di tipo 3 (ILC3). E' dimostrato che gli NTM inducano la produzione di IL-17 da parte dei linfociti T umani [58]. Il recettore per l'IL-17 è un complesso eteromero composto dal recettore per IL-17 (IL-17R)A e IL-17RC ed è espresso sulla superficie di varie tipologie cellulari incluse le cellule epiteliali, i fibroblasti, i cheratinociti, i granulociti neutrofili e eosinofili. Il legame dell'IL-17 al complesso recettoriale IL-17RA/RC induce l'attivazione delle vie the NF- $\kappa$ B and MAPK mediate da ACT1-TRAF6-TAK1 che portano alla produzione di citochine e chemochine pro-infiammatorie. I livelli sierici di IL-17 sono significativamente più alti nei pazienti con infezione da NTM rispetto ai soggetti sani e si riducono in seguito a terapia antibiotica. Ad ogni modo il ruolo di questa citochina nell'immunopatogenesi delle infezioni da NTM rimane controverso e poco chiaro [58].

E' stato osservato come le cellule Th dei bambini affetti da linfadenite da NTM presentino una ridotta capacità di differenziamento Th1 e Th17 e allo stesso tempo come, nei bambini sani, le cellule Th1 e Th17 promuovono resistenza alle infezioni da NTM. Questa osservazione che nei bambini la suscettibilità alle infezioni da NTM sia associata con una carente risposta Th1 e Th17 non si riscontra in analoghi studi condotti sui soggetti adulti [59].

## **1.3 DIAGNOSI**

### **1.3.1 Difficoltà diagnostiche**

La diagnosi è per la maggior parte dei casi tardiva o inesatta ed inoltre risulta difficile scindere una colonizzazione permanente dalla malattia vera e propria.

Questa complessità di diagnosi è riconducibile alla sintomatologia che insorge subdolamente con sintomi aspecifici con tosse produttiva, astenia, dispnea e calo ponderale mentre meno frequentemente si riscontrano febbre intermittente, emottisi e dolore toracico. Anche l'esame radiologico non risulta un metodo chiarificatore della causa delle lesioni polmonari, spesso confuse con infezione tubercolare o neoplasie polmonari [7].

La diagnosi viene complicata dal fatto che i pazienti con infezione da NTM reagiscono positivamente al Tubercolin Skin Test (TST o Mantoux), utilizzato per effettuare diagnosi di tubercolosi latente e in alcuni casi di tubercolosi attiva. Questo test non ha una specificità subottimale e non può discriminare un'infezione da *Mycobacterium tuberculosis* da quelle causate da NTM o dalla vaccinazione BCG. Più utili possono risultare i test immunodiagnostici quali l'IFN- $\gamma$  release assays (IGRAs) che sono più specifici e basati sul rilascio di IFN- $\gamma$  da parte delle cellule T dopo stimolazione con opportuni antigeni specifici per MTB. Questo tipo di test risulta negativo nei soggetti con vaccinazione BCG e nei soggetti con infezione da MAC ma possono esserci cross reazioni con altre specie di NTM [60, 61].

In generale, un'infezione da NTM viene sospettata in individui con sintomi persistenti (febbre, sintomi respiratori, lesioni cutanee) che non rispondono alle tradizionali terapie antibiotiche. Il sospetto di una infezione da NTM può aumentare se si conoscono bene le sindromi associate e si è in un contesto clinico in cui solitamente si presentano (Tabella 2) [62].

Clinical Syndrome	Most Common Species	Other Species	Risk Factors/ Associations
Pulmonary	MAC	<i>M. abscessus</i>	$\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency
	<i>M. kansasii</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. celatum</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. shimoidi</i> <i>M. malmoense</i> (Scandinavian Peninsula; Northern Europe) <i>M. malmoense</i>	Ciliary dyskinesia Cystic fibrosis GERD Bronchiectasis Pulmonary histoplasmosis Low BMI with scoliosis, pectus excavatum, mitral valve prolapse Smoking or heavy alcohol use ( <i>M. malmoense</i> ) Lymphopenia Children; 1–5 yrs Men with lung cancer
Cervical Lymphadenitis	MAC		Bathing in water from bore holes insect bites Possible association with pedicures
Skin, soft tissue infection	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. szulgai</i>	*Exposure to fish tanks or other contaminated marine water sources
	<i>M. ulcerans</i> <i>M. kansasii</i>	MAC	
Tenosynovitis	<i>M. marinum</i> *	<i>M. terrae</i>	
	MAC <i>M. abscessus</i>	<i>M. szulgai</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. xenopi</i>	
Bone disease	<i>M. kansasii</i>	MAC	May occur via direct trauma or hematogenous seeding
	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. xenopi</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>	
Disseminated disease	MAC	<i>M. kansasii</i>	Severe Immunosuppression:
		<i>M. chelonae</i>	HIV infection/AIDS (CD4 count < 50 cells)
		<i>M. abscessus</i>	SOT or stem cell transplant
		<i>M. haemophilum</i> <i>M. scrofulaceum</i>	long-term, high dose steroids
		<i>M. malmoense</i>	

Abbreviations: BMI – Body Mass Index, BSI – Blood Stream Infection, FUO – Fever of Unknown Origin, HIV – Human Immunodeficiency Virus, MAC – Mycobacterium Avium Complex, SOT – Solid Organ Transplant.

## Tabella 2 [62]. Comuni sindromi associate ad infezione da micobatteri non tubercolari

Non ci sono test patognomici per la diagnosi delle infezioni da NTM. La diagnosi richiede la correlazione dei segni clinici con riscontri radiografici e in ultima analisi la conferma microbiologica dell'agente eziologico. La raccolta dei campioni e l'esecuzione dei test devono essere ripetuti più volte per confermare o escludere un'infezione da NTM e i risultati devono essere letti e interpretati insieme a esperti specialistici nella gestione di questo tipo di infezioni, soprattutto per quei risultati che non sono in linea con i segni clinici [62].

L'analisi microbiologica è complicata dalla particolare struttura della membrana cellulare dei micobatteri che conferisce sia un tempo di duplicazione lento che una permeabilità altamente selettiva nei confronti dei coloranti. Per questo motivo la colorazione cellulare non è consigliabile poiché il protocollo per tale pratica prevede che il micobatterio sia esposto ad alte temperature e che, non ci sia possibilità di decolorazione neppure con trattamento acido cloridrico in 3% di alcol etilico [38].

Le linee guida dettate dall'American Thoracic Society (Tab. 3) garantiscono un valido aiuto per la diagnosi di micobatteriosi polmonare e si fondano sulla compatibilità del quadro clinico, isolamenti multipli o in carica elevata della specie di NTM in causa. La micobatteriosi polmonare viene diagnosticata quando si ha un quadro clinico di sintomatologia polmonare adeguata con l'esclusione di un'altra causa infettiva con aggiunta di un esame colturale proveniente da escreato o bronco-lavaggio o bronco-aspirato o biopsia, positivo [62,63].

---

**Criteri Clinici (entrambi necessari)**

1. Sintomatologia polmonare, pneumopatia di tipo cavitario o non cavitario (lesioni nodulari o bronchiectasie multifocali)
2. Esclusione di ogni altra possibile causa infettiva

---

**Criteri Microbiologici (solo uno necessario)**

1. Coltura positiva da almeno due differenti campioni di escreato
  2. Coltura positiva da almeno un campione di broncoaspirato o di lavaggio bronco-alveolare
  3. Una biopsia transbronchiale o polmonare che evidenzi caratteristiche istopatologiche patognomiche (granulomi e/o bacilli alcol-acido resistenti) e che risulti positiva alla coltura per MNT, oppure una biopsia transbronchiale o polmonare che evidenzi caratteristiche istopatologiche patognomiche associata ad uno o più escreti o lavaggi bronco-alveolari positivi in coltura per MNT
- 

**Tabella 3 [7]. Criteri di diagnosi dei micobatteri dettati dall'American Thoracic Society.**

Nelle malattie non polmonari il campione per la coltura è prelevato dal sito coinvolto.

Nelle linfadeniti, ad esempio, si può operare una biopsia excisionale o si procede al prelievo tramite ago aspirato. Quando la patologia è disseminata, si può operare una coltura microbatterica dal sangue, da biopsie provenienti dal midollo osseo oppure dal fegato.

In caso di sospetta infezione da NTM è molto importante che i campioni raccolti vengano inviati al laboratorio di analisi con una chiara notifica in modo che il personale possa processarli appropriatamente [62].

Oggi il sequenziamento del DNA è il metodo più accettato per l'identificazione e la caratterizzazione delle specie e sottospecie NTM.

Queste tecniche includono il targeted gene sequencing e il multi-locus sequence typing (MLST) che coinvolgono l'analisi di geni conservati quali *rpoB*, *hsp65*, l'RNA 16S e le regioni non codificanti dell'RNA 16S-23S (ITS) e il Whole genome sequencing (WGS) che è considerato il gold standard per le specie NTM.

Purtroppo il sequenziamento del DNA, oltre che essere costoso, richiede molta esperienza e queste tecniche non sono disponibili nei laboratori che routinariamente devono fare diagnosi di infezione da NTM nei paesi che hanno risorse limitate [20].

### 1.3.2 Diagnosi di infezione da *Mycobacterium avium complex*

*Mycobacterium avium complex* (MAC) comprende micobatteri a crescita lenta che al momento si raggruppano in *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. colombiense* ed un numero di microrganismi non classificato e nominato *M. avium-intracellulare* "cluster X". Cariche elevate di MAC vengono isolate da acqua e suolo, si tratta infatti di micobatteri moderatamente resistenti al cloro e ad una soluzione al 2% di cloruro di sodio. La fonte

d'infezione più accreditata è in forma di aerosol. Il paziente tipo contraente è maschio bianco anziano affetto da pneumopatia cronica, ma recentemente è stata descritta una nuova forma clinica che colpisce donne anziane con pneumopatie croniche ed anomalie della gabbia toracica predisponenti. Tale condizione prende il nome di Lady Windermere, caratterizzata da tosse produttiva con escreato purulento con un quadro radiologico con piccoli infiltrati nodulari e bronchiectasie localizzate nel lobo superiore nella lingula. L'indagine diagnostica anche in questo caso non è standardizzata e ci si attiene alle linee guida dell'American Thoracic Society [64].

### **1.3.3 Diagnosi di infezione da *Mycobacterium kansasii***

*Mycobacterium kansasii* in USA e Repubblica Ceca rappresenta la specie più frequentemente responsabile di infezione polmonare in individui immunocompetenti. Viene classificato come micobatterio fotocromogeno, a crescita lenta, suddiviso generalmente in cinque sottotipi diversi data la specie eterogenea. Il sottotipo I è isolato spesso dai materiali clinici rispetto l'ambiente, mentre il sottotipo II è frequentemente isolato dalle fonti ambientali e svolge un ruolo come opportunisto di soggetti immunocompromessi. I sottotipi III, IV, V sono anch'essi isolati da campioni ambientali come le condotte idriche ma l'isolamento da campioni umani è meno frequente. Tutte le specie di *M. kansasii* possono sopravvivere all'interno di acque per più di un anno, ma non possono resistere così a lungo nel suolo. Il target di individui infettati sono maschi bianchi anziani con una storia di pregressa patologia polmonare, che presentano delle lesioni polmonari unilaterali nel lobo superiore destro [7, 65].

### **1.3.4 Diagnosi di infezione da *Mycobacterium xenopi***

Dati epidemiologici indicano l'usuale presenza di *Mycobacterium xenopi* nelle condotte idriche, che si dimostrano la fonte principale di infezione. È stata documentata la sua crescita ottimale a 45°C quindi i sistemi termoidraulici sono la sua più importante nicchia ecologica. Il paziente con micobatteriosi polmonare è solitamente un individuo anziano con tosse persistente, febbricola e calo ponderale. A livello radiologico il soggetto presenta cavità a pareti sottili nel lobo polmonare superiore, associate a lesioni fibro-nodulari di diametro 1-3 cm. Data la lenta crescita a 37° C anche in terreni in sospensione, l'isolamento di questa specie risulta difficile, quindi l'incubazione delle colture deve essere prolungata oltre le sei settimane. Un trial condotto dalla British Thoracic Society ha registrato che la pneumopatia da *Mycobacterium xenopi* risulta avere tassi di mortalità più alti rispetto le altre, ciò è

attribuibile in gran parte alla inesistenza di un protocollo di trattamento standardizzato che permetta la corretta eradicazione del micobatterio in questione [7].

### **1.3.5 Diagnosi di infezione da Micobatteri a crescita rapida**

Micobatteri a crescita rapida sono un sottogruppo caratterizzato da una crescita visibile dopo sette giorni in terreno solido. Ne fanno parte le specie come *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. fortuitum* che producono pneumopatia in casi rari ed eccezionali. La diffusione frequentemente avviene da fonti idriche ed è molto facile entrarci in contatto, ma perché la pneumopatia possa manifestarsi, il soggetto, deve avere una o più condizioni favorevoli, quali: neoplasie, acalasia, fibrosi cistica o precedenti infezioni da micobatteri. I pazienti tipo ad oggi risultano essere donne di circa 60 anni, non fumatrici, con tosse produttiva, febbricola, emottisi e calo ponderale. La diagnosi microbiologica è semplice e serve soprattutto per stabilire un trattamento adeguato al tipo di micobatterio isolato [7, 66].

### **1.3.6 Diagnosi di linfadenite da NTM**

Le linfadeniti sono caratterizzate da gonfiore unilaterale dei linfonodi cervicali, non dolente, che colpiscono principalmente i bambini. La via d'ingresso dell'agente eziologico risulta essere la cavità orale, la patologia si manifesta quasi esclusivamente in fase infantile per la consueta abitudine dei bambini di portare le mani alla bocca durante l'eruzione dentaria. Inoltre, giocano un ruolo predisponente le faringiti acute che si verificano maggiormente nelle stagioni fredde. Viene riportata un'incidenza del 35-40% ogni anno, solitamente in soggetti di età inferiore ai 4 anni. Il decorso clinico è imprevedibile, l'infezione colpisce principalmente i linfonodi cervicali superiori che possono regredire o evolvere in eventi di colliquazione o formazione di fistole in cui il drenaggio può prolungarsi nel tempo; negli stadi più avanzati del processo flogistico, la cute soprastante diventa eritematosa. La diagnosi precoce è inesistente, si procede all'esame colturale solo dopo l'escissione chirurgica, ma in alcuni pazienti si riscontra una positività per il test della tubercolina. La specie MAC è responsabile del 75% delle linfadeniti cervicali, ma queste infezioni sono attribuibili anche ad altri NTM. Un esempio è *M. scrofulaceum* considerato agente eziologico della scrofula, patologia dell'infanzia eccezionale nell'adulto. Oppure si considerano sottostimati *M. haemophilum* e *M. malmoense*, a causa del loro isolamento difficoltoso [7].

### **1.3.7 Altre infezioni da NTM**

Altri distretti possono essere sede d'infezione NTM come pelle e tessuti molli come risultato di traumi o interventi chirurgici; si ha la comparsa entro un mese di lesioni cutanee o sottocutanee nodulo-granulomatose di cui sono responsabili quasi tutte le specie di micobatteri a crescita rapida. Inoltre, si possono notare infezioni osteo-articolari a carico delle sinovie, guaine tendinee, tessuto osseo e dischi intervertebrali, che si verificano come conseguenza di fratture aperte, traumi invasivi o ferite chirurgiche. Nei casi più estremi si può avere la perdita della funzionalità, necrosi dell'osso e formazione di granuloma [7, 63].

## **1.4 TRATTAMENTO**

Una volta diagnosticata l'infezione batterica NTM, grazie alle linee guida dell'American Thoracic Society ed esclusa ogni forma di colonizzazione non patogena, non vi è altro rimedio che intraprendere un percorso farmacologico. Le misure preventive, che potenzialmente potrebbero impedire la trasmissione del batterio, dimostrano che l'utilizzo di acque profonde a scopo umano sia da preferire alle risorse idriche superficiali. Infatti, la potabilizzazione delle acque non determina la completa eradicazione delle colonie, sia utilizzando disinfettanti a base di cloro o monoclorammina [67].

Il trattamento delle infezioni da NTM è complesso e limitato da diverse problematiche. E' richiesto un regime multifarmaco di lunga durata con l'utilizzo di sostanze spesso associate con numerose reazioni avverse e che non vengono ben tollerate. Le comorbidità, spesso già presenti nei pazienti con infezione da NTM, aggiungono altri ostacoli per la gestione di questi casi [62]. Per questi motivi la terapia viene iniziata solo quando la diagnosi è certa.

La terapia multifarmaco consta di una tipologia di sostanze che utilizzate in varie combinazioni a seconda del risultato dell'antibiogramma e della terapia domiciliare del paziente. Questo gruppo comprende:

- Azitromicina (batteriostatico) macrolide che blocca la sintesi proteica
- Etambutolo (batteriostatico) chemioterapico che altera la sintesi della parete batterica
- Claritromicina (batteriostatico) macrolide che blocca la sintesi proteica ribosomiale
- Rifampicina (battericida) rifamicina che inibisce la RNA polimerasi DNA dipendente.

Tale trattamento viene intrapreso per un periodo di tempo molto lungo, da 12 a 18 mesi, accompagnato dai consueti controlli di routine quali: analisi emocromo, esami microbiologici degli escreti e radiografia. Il capolinea è la totale eradicazione del micobatterio, ma esistono casi in cui il trattamento può essere non risolutivo della malattia o possono verificarsi delle recidive [7,38,68].

Per quanto riguarda le linfadeniti infantili, il trattamento antibiotico risulta generalmente inefficace per la completa eradicazione dell'infezione e non esiste un protocollo standardizzato. Nella maggior parte dei casi, si procede con l'asportazione chirurgica dei linfonodi coinvolti, che nelle fasi precoci della malattia, impedisce la progressione della lesione e il relativo danno estetico. Ma nel 20% dei sottoposti, in cui l'escissione è tardiva, si hanno recidive che possono richiedere un ulteriore intervento. Inoltre, si procede con terapia a base di claritromicina e rifamicina, quando la rimozione del tessuto danneggiato presenta un alto margine di rischio [7].

#### **1.4.1 Antibiotico-resistenza**

Le cure antibiotiche necessarie per curare le infezioni da NTM derivano da anni di pratica clinica ma sono per lo più empiriche, possono durare 18 mesi, sono costose e spesso associate a tossicità farmaco-correlata ed effetti avversi. Uno dei maggiori problemi correlati all'utilizzo di queste terapie è rappresentato dalla scarsa suscettibilità dei micobatteri a parecchi antibiotici, inclusi quelli utilizzati per la cura della tubercolosi [69].

Dato il fatto che gli NTM sono microrganismi ambientali, non sorprende che abbiano sviluppato degli elaborati meccanismi di resistenza agli antibiotici. L'ambiente, in particolare la rizosfera, è un duro luogo in cui sopravvivere poiché c'è una forte competizione interspecifica per l'habitat ed il nutrimento. Pertanto è vantaggioso che qualsiasi organismo possa idealmente svolgere due importanti funzioni in tale scenario, vale a dire sviluppare meccanismi di antibiotico-resistenza per evitare che gli antibiotici naturali vengano escreti come metaboliti secondari dai batteri vicini, nonché avere la capacità a loro volta di espellere nuovi antibiotici naturali e/o composti simili agli antibiotici, per sopprimere la crescita e la proliferazione degli altri organismi. Sebbene gli NTM siano altamente evoluti in relazione allo sviluppo di meccanismi di antibiotico-resistenza, la loro capacità di produrre composti antimicrobici è limitata [70].

L'antibiotico-resistenza può essere dovuta a fenomeni intrinseci (naturali) o acquisiti.

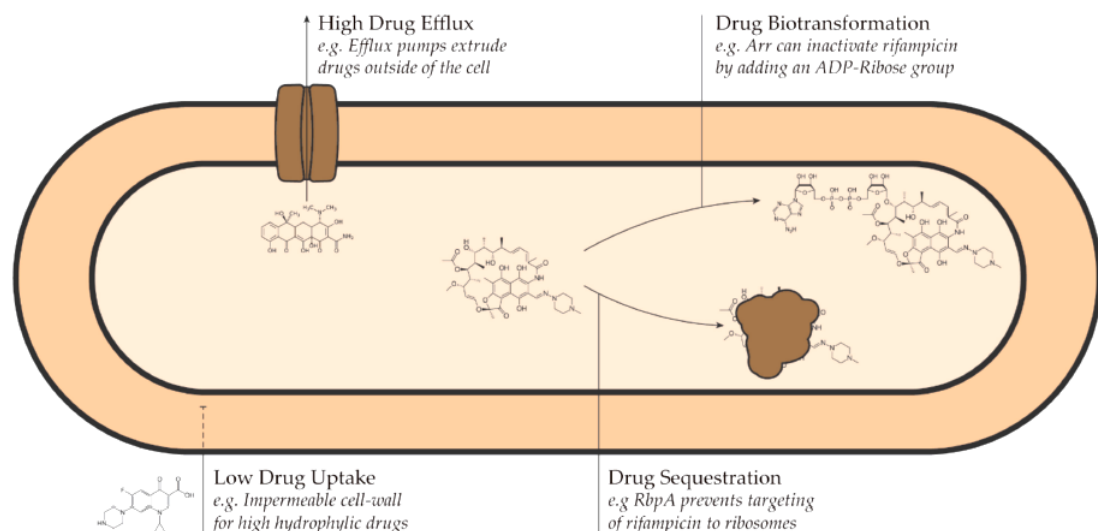
La resistenza intrinseca descrive la situazione in cui un organismo possiede delle caratteristiche che gli permettono di tollerare un particolare farmaco o sopravvivere in

ambienti ostili. I meccanismi intrinseci di antibiotico-resistenza includono lo spessore e l'impermeabilità della parete cellulare, la loro presenza in biofilm e granulomi, che effettivamente diminuiscono l'ingresso dei farmaci e l'espressione di proteine bersaglio degli antibiotici utilizzati.

L'antibiotico-resistenza acquisita si riferisce a quei casi in cui un ceppo resistente emerge da una popolazione che in precedenza era farmaco-sensibile. Questa di solito è correlata all'uso di trattamenti antibiotici prolungati, come nel caso della cura delle infezioni da NTM. L'antibiotico-resistenza acquisita è particolarmente grave nel caso di NTM che presentano una singola copia dei geni che codificano per le comuni proteine target come i ribosomi, aumentando il rischio di acquisire mutazioni con terapie a singolo farmaco. Concettualmente la resistenza ai farmaci antimicrobici può essere il risultato di uno o più dei seguenti meccanismi [69, 71]:

- Diminuzione dell'ingresso del farmaco
- Aumento dell'estrusione del farmaco
- Aumento del metabolismo del farmaco
- Riduzione del sequestro del farmaco

Questi meccanismi sono schematizzati in Figura 2.



**Figura 2 [69]. Rappresentazione schematica dei meccanismi intrinseci di farmaco-resistenza nei batteri**

Di fronte all'aumento della prevalenza, all'elevata mortalità e le sfide associate al trattamento delle infezioni da NTM, si richiedono urgentemente nuove opzioni terapeutiche. Una via promettente nella ricerca è rappresentata dalle terapie dirette sull'ospite (Host directed therapies, HDTs). Le HDTs coadiuvano le terapie antibiotiche e differiscono da

quest'ultime poiché sono dirette verso bersagli dell'ospite più che del patogeno. L'obiettivo delle HDTs è quello di aumentare le risposte immuni protettive dell'ospite, specialmente quelle inibite o modificate dal patogeno e quello di prevenire l'eccessiva infiammazione patologica. Diversamente dai nuovi agenti antimicrobici esse hanno il vantaggio di non provocare farmaco-resistenza o cross-resistenza verso i convenzionali antibiotici. Sebbene le HDT rappresentino un'area di attiva investigazione nelle terapie per la cura della tubercolosi, così come per quella delle infezioni da microrganismi non-tubercolari, ancora la ricerca in questo senso non è molto attiva per le infezioni causate da MAC [72].

## **1.6 NANOTECNOLOGIE E NANOMEDICINA**

### **1.5.1 Le Nanotecnologie**

Il prefisso “nano” deriva dal greco e indica qualcosa di molto piccolo definito nell'ordine di grandezza di un miliardesimo di metro ( $10^{-9}$  m). Lavorando a queste dimensioni la materia acquista delle proprietà particolari che possono tornarci utili nella pratica quotidiana. Bisogna distinguere la nanoscienza dalle nanotecnologie. La nanoscienza è lo studio delle strutture e delle molecole comprese tra 1 e 100 nm che combina studi di fisica, scienza dei materiali e biologia al fine di manipolare la materia su scala atomica e molecolare. Le tecnologie che si avvalgono di questi studi nelle applicazioni pratiche prendono il nome di nanotecnologie e figurano tra le più promettenti del 21 secolo.[73].

Le nanotecnologie progettano, caratterizzano, producono e applicano strutture, strumenti e sistemi controllando la forma e le dimensioni della materia nell'ordine di grandezza nanometrico.

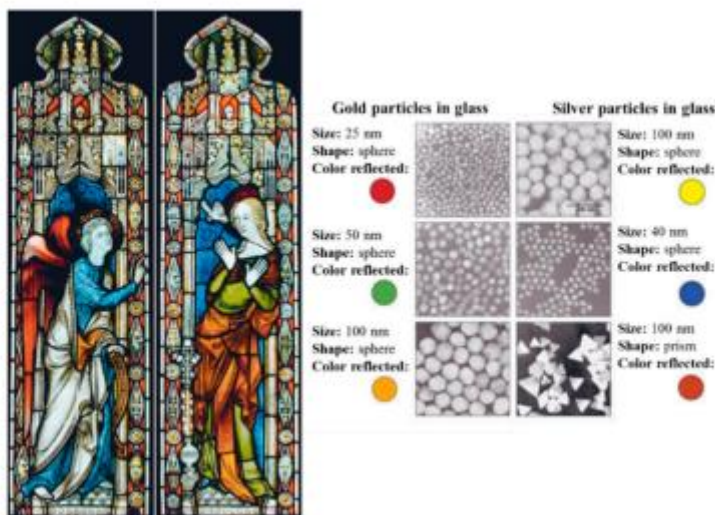
Le proprietà dei materiali possono essere differenti quando si lavora nella nanoscala per due ragioni principali:

- 1- I nanomateriali presentano una superficie esterna molto più ampia se comparati alla stessa massa dello stesso materiale prodotta in macro-dimensioni. Questo fa sì che il materiale in questione sia chimicamente più reattivo (in alcuni casi materiali che sono inerti a dimensioni normali diventano reattivi a dimensioni nanoscopiche) e questo altera la loro forza e le proprietà elettriche.
- 2- L'effetto quantico può iniziare a dominare il comportamento della materia nella nanoscala modificando il comportamento elettrico, ottico e magnetico dei materiali.

I nanomateriali possono essere prodotti in una dimensione (esempio superfici di rivestimento molto sottili), in due dimensioni (esempio nanofili e nanotubi) o in tre dimensioni (esempio nanoparticelle, NP) [74].

Il padre delle nanotecnologie moderne è considerato il premio Nobel Richard Feynman che in una lettura del 1959 ad un convegno dell' American Physical Society a Caltech presentò una lettura intitolata "There's Plenty of Room at the Bottom" (C'è un sacco di spazio là in fondo), nella quale introdusse il concetto di manipolazione della materia a livello atomico. La sua idea era semplice ma intrigante. Proponeva la costruzione di macchinari progettati per la costruzione di altri macchinari identici ai primi, ma con un'unica differenza, quella di essere più piccoli. "Questi a loro volta potrebbero costruire altre copie di dimensioni ancora più ridotte e così via fino ad ottenere macchinari talmente minuti da poter essere contenuti in un batterio." Quasi 15 anni dopo uno scienziato giapponese, Norio Taniguchi, usò il termine "nanotecnologia" per descrivere processi conduttori che avvenivano in scala nanometrica. Solo negli anni 80 con la scoperta del microscopio a scansione tunnel (1982) e di quello a forza atomica (1986) si sono spalancate definitivamente le porte della nanoscala per il mondo della ricerca [74, 75].

Nonostante non si conoscesse ancora la natura della materia, le nanotecnologie venivano usate anche in tempi antichi, addirittura prima della nascita di Cristo. Ne sono esempi la coppa di Licurgo presente al British Museum di Londra che cambia colore in base a come viene illuminata dalla luce (verde se illuminata direttamente, rossa se la luce passa attraverso il vetro) oppure le vetrate delle antiche chiese medioevali che risplendevano di rosso e giallo grazie alla dispersione di particelle d'oro e argento nel vetro (figura 3) [73]



**Figura 3. Effetto delle nanoparticelle sui colori delle vetrate delle chiese medioevali**

La natura non manca di esempi in cui strutture nanoscopiche permettono di acquisire delle proprietà particolari che possono fare da spunto per creare nuovi prodotti o dispositivi. Un

esempio è il cosiddetto effetto “loto” grazie al quale il nasturzio mantiene pulite le sue foglie. Con un microscopio elettronico a scansione ESEM si può notare il modo in cui le goccioline d’acqua scorrono via dalla superficie delle foglie senza aderirvi. Questo fenomeno è dovuto alla superficie rugosa delle foglie che fa rapidamente scivolare via l’acqua ed insieme anche la sporcizia. L’effetto loto, studiato approfonditamente dal professor Barthlott e dai suoi collaboratori dell’università di Bonn – è già stato utilizzato in una gamma di prodotti, come le pitture per esterni su cui l’acqua scivola via portando con sé lo sporco oppure nella pittura delle ceramiche sanitarie. I gechi possono arrampicarsi sui muri, correre a testa in giù sul soffitto e persino rimanervi aggrappati con una zampa sola grazie alla nanotecnologia. I loro polpastrelli sono ricoperti di peli finissimi talmente adattabili che possono avvicinarsi a qualche nanometro dal supporto, ricoprendo superfici molto ampie. A quel punto entra in gioco il cosiddetto legame di Van der Waals, una forza debolissima ma che, moltiplicata per i milioni di punti di aderenza, sostiene il peso del gecko. Il legame si scioglie facilmente per “spellatura”, nello stesso modo in cui si stacca un nastro adesivo. Il gecko riesce così a correre sul soffitto. Sono già allo studio numerosi materiali che tentano di riprodurre questa incredibile capacità [74].

Oggi le nanotecnologie trovano impiego in qualunque campo tecnologico e industriale. Sono utilizzate per produrre materiali e processi che utilizziamo quotidianamente come schermi telefonici più resistenti, batterie più leggere, abbigliamento idrorepellente, prodotti sportivi più leggeri ed efficienti etc), nelle apparecchiature elettroniche al fine di renderle più veloci, piccole e portabili, dispositivi che possano contenere grandi quantitativi di informazioni, per produrre metodi alternativi di produzione dell’energia e per rimuovere inquinanti ambientali. Le nanotecnologie stanno anche spopolando in campo medico per produrre strumenti medici, conoscenza e metodi terapeutici. La nanomedicina, cioè l’applicazione delle nanotecnologie al campo medico, attinge alla scala naturale dei fenomeni biologici per produrre soluzioni precise per la prevenzione, la diagnosi e il trattamento delle malattie [76].

### **1.5.2 Nanomedicina e antibiotico-resistenza**

L’applicazione delle nanotecnologie a scopo medico prende il nome di nanomedicina e si definisce come l’uso di materiali nanoscopici per la diagnosi, il monitoraggio, il controllo, la prevenzione e il trattamento delle malattie [77]. L’utilizzo delle nanotecnologie per lo sviluppo di nuovi medicinali è parte integrante della ricerca e nell’Unione Europea (EU) è stata riconosciuta come una Key Enabling Technology capace di apportare nuove e

innovative soluzioni mediche per affrontare bisogni insoddisfatti nel campo della medicina [78]. Molti trattamenti basati sulla nanomedicina sono già stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e sono disponibili per l'uso clinico per il trattamento dei tumori, del colesterolo alto, per le malattie autoimmuni, le infezioni fungine, le degenerazioni molecolari e l'epatite, solo per portare alcuni esempi. Applicazioni aggiuntive includono le vaccinazioni, metodi di contrasto per la risonanza magnetica (MRI), marcature biologiche fluorescenti, rilevazione di patogeni, identificazione proteica, ingegnerizzazione tissutale, agenti per il trasporto di farmaci e geni e detezione di biomarkers [79]. In breve quindi i nanomateriali possono essere utilizzati a scopo medico principalmente in tre differenti aree: la diagnosi (nanodiagnostica), trasporto controllato di sostanze (nanoterapia) e la medicina rigenerativa. Una quarta area che combina diagnosi e terapia sta emergendo come approccio promettente per racchiudere nello stesso sistema la possibilità di avere la diagnosi ed il trattamento, la teranostica.

La nanomedicina ha così permesso di utilizzare delle sostanze che altrimenti non potrebbero essere usate a causa della loro elevata tossicità (Mepact), di sfruttare molteplici meccanismi d'azione (Nanomag, gel multifunzionali), di massimizzare l'efficacia (ad esempio aumentando la biodisponibilità) e ridurre le dosi e la tossicità, favorire il targeting dei farmaci, il rilascio controllato e sito-specifico, permettendo una distribuzione preferenziale all'interno del corpo e facendo diminuire gli effetti avversi (ad esempio favorire il targeting di un farmaco nel sito tumorale) e permettere l'attraversamento della barriera ematoencefalica [78]. I linfociti T mielina-specifici, ingegnerizzati con nanoparticelle di magnetite, inoculati in topi affetti da encefalomielite autoimmune, modello animale di sclerosi multipla, sono stati ritrovati con successo a livello cerebrale, dimostrando come queste cellule siano in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e portare in siti specifici del sistema nervoso centrale nanoparticelle utili per fini teranostici [80].

Nell'ideazione, progettazione e sperimentazione di nanoparticelle e nanomateriali che si intendono usare per scopi medici sono di fondamentale importanza la valutazione della biocompatibilità e della loro tossicità sui sistemi biologici [78].

L'organizzazione Mondiale della Sanità afferma che la resistenza agli antibiotici, non solo per le infezioni da micobatteri come precedentemente discusso, rappresenta uno dei maggiori problemi che affliggono la salute pubblica e la nanomedicina può fornire un valido aiuto per cercare soluzioni diagnostico/terapeutiche alternative nella cura delle malattie infettive [81-89]. Ad oggi esistono almeno 51 nanofarmaci approvati dalla FDA tra cui vi sono anche trattamenti per le infezioni [87].

Un esempio di come le nanotecnologie possano essere utilizzate nel combattere le infezioni è rappresentato dai nanosistemi che effettuano il delivery degli antibiotici in siti specifici del corpo (nanodelivery) [81, 82].

Questi sistemi sono stati proposti ad esempio per quelle infezioni che sono molto difficili da eradicare in quanto i batteri crescono all'interno di biofilm, i quali rappresentano sistemi evoluti in grado di permettere ai batteri di sopravvivere e avere una maggiore protezione negli ambienti ostili [81,90].

La presenza di biofilm si riscontra in varie situazioni patologiche infettive a livello polmonare, del colon, dell'uretra, dell'occhio e dell'orecchio così come nelle endocarditi infettive e nelle infezioni da ferita. La nanomedicina può giocare un ruolo cruciale nell'aumentare l'efficacia e la stabilità di terapie antibiotiche esistenti e favorendo la loro internalizzazione all'interno dei biofilm, diminuendone l'estrusione da parte dei batteri e fornendo un'efficace sistema di trasporto sito-specifico che permette di ridurre gli effetti indesiderati se comparati con l'utilizzo del farmaco libero. Questi nanosistemi si suddividono in due categorie:

- Nanosistemi organici: liposomi, nanoparticelle lipidiche, micelle polimeriche e nanoparticelle polimeriche che racchiudono antibiotici e li portano laddove sono necessari.
- Nanosistemi inorganici: nanoparticelle di argento, silicio, magnetiche, di ossido di zinco, cobalto, selenio e cadmio. Delle proprietà antimicrobiche delle nanoparticelle inorganiche verrà discusso più avanti [81,88].

Oltre che nell'utilizzo per cercare di debellare patogeni racchiusi nei biofilm le terapie antibiotiche bersaglio possono essere dirette verso fagociti infetti oppure sui batteri liberi.

I patogeni intracellulari, come i micobatteri tubercolari e non tubercolari, sono in grado di sopravvivere e riprodursi all'interno dei fagociti e in questo modo sfuggono con più facilità all'azione delle terapie dirette contro di loro. In effetti le concentrazioni di antibiotico ottimali non possono essere raggiunte in questi compartimenti a causa della scarsa permeabilità cellulare e dell'instabilità intracellulare delle terapie, risultando in una mancata eliminazione dell'agente infettivo. I sistemi di nanodelivery hanno mostrato di poter aumentare l'uptake e la distribuzione dei farmaci da parte delle cellule di mammifero, aumentando così l'effetto terapeutico degli antibiotici [82]. Il trasporto dei farmaci al sito bersaglio è favorito dall'uso di materiali biocompatibili e preferibilmente biodegradabili che possono usare strategie di targeting sia passive che attive. Questi meccanismi sono principalmente controllati dalle proprietà fisico-chimiche delle nanoparticelle

(composizione, dimensioni, forma, potenziale zeta, superficie...). Il targeting passivo è favorito da un aumento della permeabilità e ritenzione che dipendono proprio dalle caratteristiche chimico fisiche delle nanoparticelle. Inoltre è possibile far rilasciare il farmaco contenuto nella nanoparticella esclusivamente nel sito in cui sono presenti i batteri da eradicare, dove vi è un pH alterato, ROS, presenza di specifici enzimi batterici. Il targeting attivo invece si realizza grazie a specifiche interazioni tra la il nanosistema di trasporto e le cellule bersaglio. I nanosistemi di delivery infatti sono spesso rivestiti da particolari ligandi in grado di legarsi alla superficie delle cellule batteriche o di cellule infettate da batteri e di entrare al loro interno mediante meccanismi di endocitosi. Inoltre il rivestimento delle nanoparticelle con polimeri biocompatibili (polietilen-glicole, PEG) prolunga il tempo di circolazione nel sangue prevenendo l' opsonizzazione e riducendo l'assorbimento da parte del sistema reticolo-endoteliale [88].

E' possibile quindi favorire l'uptake delle nanoparticelle nelle cellule dell'ospite attraverso la funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle in modo da permettere l'eradicazione dei batteri intracellulari, come gli NTM. Il guscio o core nanoparticolato può racchiudere anche più di un farmaco. La forma, le dimensioni e la carica di superficie delle nanoparticelle possono essere finemente modulate in modo da ottimizzare il trasporto ed il rilascio nel sito bersaglio. Le nanoparticelle usate come nanosistemi per il trasporto di antibiotici possono essere formate da metalli inorganici, polimeri, lipidi, micelle, silicio o membrane cellulari [87]

Le principali forme di targeting attivo delle cellule bersaglio includono interazioni elettrostatiche non specifiche e il riconoscimento di specifici ligandi da parte di recettori tra cui il recettore del mannosio, il recettore per CD44, ed il recettore per la tuftsin.

Ad esempio sistemi di nanodelivery mannosio-funzionalizzati possono specificatamente riconoscere il recettore del mannosio over-espresso sulla superficie dei macrofagi, favorendo così l'effetto terapeutico sui macrofagi infetti. Sistemi simili contenenti rifampicina sono risultati efficaci contro *M.tuberculosis* e *M. Avium* in modelli di infezione di macrofagi [82]. In più vari nanosistemi possono fornire una maggior efficacia e basso tasso di estrusione per le terapie combinate, incluso l'uso della terapia fotodinamica e la terapia fototermica che permettono il rilascio controllato nel tempo e nello spazio dei farmaci, interagendo con le nanoparticelle che li trasportano.

L'effetto fotodinamico e l'effetto fototermico sono proprietà particolari che hanno le nanoparticelle metalliche e possono essere sfruttate sia per fini terapeutici che diagnostici.

### **1.5.3 Nanoparticelle metalliche: agenti antibatterici**

Le nanoparticelle metalliche e di ossidi di metalli hanno destato l'interesse medico grazie alle loro proprietà ottiche, magnetiche ed elettriche che le rendono strutture nanoscopiche molto versatili e con un grande potenziale sia per la diagnosi selettiva che per la terapia delle malattie infettive. I vantaggi delle nanoparticelle basate sui metalli sono la superficie estremamente ampia, la forma e dimensione controllabile con precisione, la possibilità di modificare le molecole di superficie ed inoltre posseggono speciali proprietà ottiche, meccaniche, chimiche, plasmoniche e superparamagnetiche [84,85]. Alcuni nanomateriali infatti possono rispondere differenzialmente a diversi stimoli esterni come ad esempio la luce nel caso dell'effetto fotocatalitico e fototermico oppure il magnetismo nel caso dell'ipertermia indotta, fenomeni che non possono essere sfruttati con gli stessi materiali a dimensioni macroscopiche.

L'attività antimicrobica passiva delle nanoparticelle metalliche è stata esplorata nell'ultimo ventennio e si basa principalmente sul rilascio di ioni metallici e generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), nonché sull'interazione con le membrane cellulari che porta alla disgregazione e quindi alla morte delle cellule. I nanomateriali metallici, che sono per lo più carichi positivamente, si possono legare alle componenti negative della membrana plasmatica per mezzo di interazioni elettrostatiche che alterano l'integrità della membrana e fanno produrre ROS. Gli ioni metallici, che si formano in maniera più consistente in scala nanoscopica rispetto a quella macroscopica, oltre che danneggiare le membrane e portare alla produzione di ROS, colpiscono gli enzimi ed il DNA batterico [85].

Agenti antimicrobici classici sono l'argento ed il rame, usati da lungo tempo come disinfettanti per l'acqua e per la conservazione di cibi, bendaggi e suture ma lo spettro dei metalli che presentano attività antimicrobica si è ampliato con lo sviluppo della nanotecnologia avanzata [84,85].

E' risaputo come l'argento nanoscopico possieda una forte attività battericida verso una gran varietà di batteri. La notevole azione antibatterica delle nanoparticelle di argento si esplica grazie all'ampia superficie che fornisce ampio contatto con la membrana batterica, portando alla dispersione cellulare e all'inibizione della proliferazione. In aggiunta al legame con le macromolecole, il suo contatto con la membrana cellulare porta alla disintegrazione della cellula e quindi alla morte.

Un ampio spettro di materiali ha dimostrato di avere proprietà antibatteriche, tra questi troviamo l'ossido di ferro (III), l'ossido di zinco, l'ossido di magnesio, l'argento, l'oro, il rame, gli ossidi di rame, gli ossidi di titanio e di cadmio [85].

Il meccanismo mediante il quale le nanoparticelle di ossido di zinco (ZnO-NPs) operano da agenti antimicrobici è fondato sulla loro capacità di danneggiare l'integrità della membrana cellulare, di diminuire l'idrofobicità della superficie e down-regolare certi geni. Inoltre sono in grado di indurre la produzione di ROS e di inibire la formazione di biofilm.

L'azione antimicrobica del cobalto è piuttosto dibattuta ma sembra migliorare in presenza di luce ultravioletta (UV) o allo stato di nanosospensione preparata come emulsione. In questi casi le nanoparticelle di cobalto hanno mostrato di poter far avvizzire le cellule batteriche (*S. aureus*), formare dei buchi nella membrana, cambiare la morfologia e rompere la parete delle cellule.

Il selenio ha dimostrato di avere proprietà larvicida verso il quarto stadio delle larve di *Aedes aegypti*, il vettore che causa la febbre di dengue e proprietà antibatteriche nei confronti sia di batteri Gram-positivi che Gram-negativi. Inoltre presenta una bassa citotossicità nei confronti delle cellule umane [81].

Purtroppo molte di queste nanoparticelle metalliche sono tossiche in natura e sono poco biocompatibili a meno che non le si rivestano con molecole molto costose [86] il che rende svantaggioso il loro utilizzo.

L'attività antimicrobica attiva di alcuni nanometalli può essere attivata dalla luce e questo è reso possibile da una particolare proprietà delle nanoparticelle metalliche, la risonanza plasmonica di superficie (SPR) [84]. Si possono distinguere in questo caso un effetto fotocatalitico, in cui le nanoparticelle (semiconduttori come il biossido di titanio) se illuminate con una particolare lunghezza d'onda provocano il rilascio di ROS ed un effetto fototermico in cui l'assorbimento della luce da parte del nanomateriale provoca un considerevole aumento localizzato della temperatura. La terapia fototermica è stata tradizionalmente sviluppata come trattamento bersaglio per uccidere le cellule tumorali ed è stata proposta come promettente soluzione per il trattamento delle infezioni batteriche perché può essere controllata ed è localizzata nella zona dell'infezione. Coniugando infatti specifici anticorpi alla superficie della nanoparticella, la si forza a direzionarsi nel sito in cui risiede il patogeno e si può così provocare questo innalzamento della temperatura che promuove la morte cellulare a causa di denaturazione delle proteine, induzione delle heat shock protein, interruzione di segnali metabolici e rottura della membrana cellulare. Per questo fenomeno sono state solitamente usate NP d'oro ma sono allo studio anche altri materiali.

Un fenomeno simile ma basato sulle proprietà magnetiche delle nanoparticelle è quello dell'ipertermia [85]. Per questa metodica vengono utilizzate le nanoparticelle magnetiche che stanno emergendo sempre di più come materiali promettenti per le applicazioni

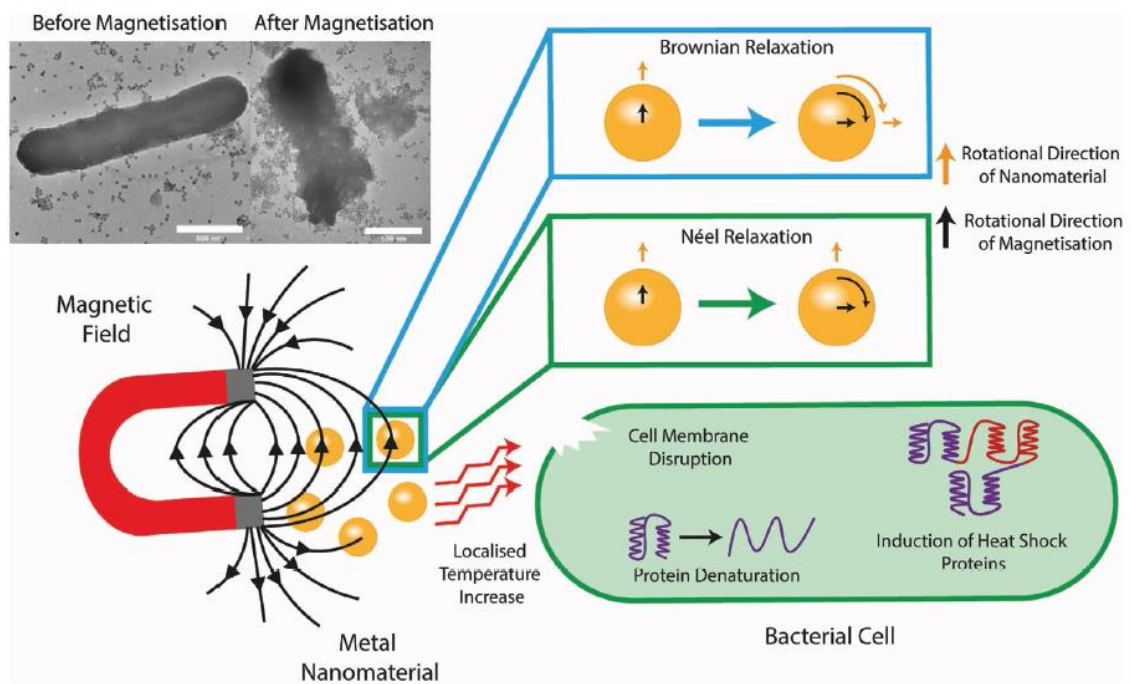
biomediche. Ci sono due tipi principali di nanoparticelle di ossido di ferro (IONPs), chiamate magnetite e maghemite. La magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) è uno degli ossidi di ferro con proprietà ferromagnetiche, può essere attratto da una calamita e può essere magnetizzato in modo permanente. La maghemite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ha la stessa struttura a spinello della magnetite ed è anch'essa ferromagnetica. Le IONPs sono superparamagnetiche e mostrano il loro magnetismo sotto l'effetto di un campo magnetico esterno; quando questo viene rimosso si smagnetizzano istantaneamente [85,86].

Sebbene questo tipo di nanoparticelle diano i loro risultati migliori in presenza di un campo magnetico, possono risultare strumenti utili anche in sua assenza. Ad esempio è dimostrato che le IONPs possano agire come agenti fisici che prevengono la formazione di biofilm. Possono ad esempio essere rivestite da sostanze che ne incrementano le proprietà antibatteriche come l'acido oleico, che si è dimostrato efficace nell'inibire la crescita soprattutto di batteri Gram-positivi [86]. Inoltre se si lega alla superficie delle IONPs un classico antibiotico, insieme ad un sistema di targeting attivo, si può fare in modo che le nanoparticelle così strutturate arrivino direttamente nel sito di infezione, si leghino alla superficie batterica insieme all'antibiotico trasportato, aumentandone l'efficacia [86].

L'efficacia maggiore nell'utilizzo delle IONPs per far fronte a batteri antibiotico-resistenti la si ottiene però applicando un campo magnetico. Funzionalizzando le IONPs in modo che siano dirette verso un target specifico, ad esempio un batterio o una cellula infettata, esse si dirigeranno nella zona bersaglio. Applicando un campo magnetico fluttuante si fa in modo che esse dissipino energia sottoforma di calore causando un notevole aumento della temperatura nella zona di interesse. Questo fenomeno è chiamato ipertermia magnetica [83,85] e, come avveniva per l'effetto fototermico, provoca la morte cellulare (Figura 4).

Inoltre allo stesso tempo, con una semplice risonanza magnetica, si può fare la diagnosi del sito di infezione insieme alla la terapia eradicante.

Questo approccio si sta rivelando un'efficace strumento per la diagnosi e il trattamento dei tumori (teranostica) [91,92]. L'utilizzo di IONPs è infatti conveniente poiché oltre ad avere un'elevata efficacia e ridurre gli effetti indesiderati della terapia in quanto estremamente localizzata, è economicamente vantaggiosa. La sintesi delle IONPs infatti è semplice e poco costosa, è riproducibile su larga scala, fattibile senza produzione di sostanze tossiche e la loro tolleranza da parte dei sistemi biologici è elevata [83,91] e questo le rende ottimi candidati come alternativa all'utilizzo degli antibiotici nei casi di antibiotico-resistenza.



**Figura 4 [85]. Rappresentazione schematica dell'ipertermia magnetica dei materiali superparamagnetici e conseguente meccanismo antimicrobico**

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

Alla luce delle difficoltà diagnostiche nell'identificazione delle infezioni da NTM e dell'importanza di avere una corretta diagnosi finalizzata al complicato trattamento di queste patologie, in questo studio è stato valutato il ruolo di tre citochine fondamentali nella risposta immune ai micobatteri, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17, in soggetti con infezione NTM, sani e controlli di malattia, allo scopo di identificare biomarcatori ematici da poter utilizzare a fine diagnostico in test enzyme-linked immunoSpot (ELISpot).

Una parte dello studio è stata condotta su una popolazione pediatrica di soggetti infetti testando la produzione da parte dei linfociti T delle tre citochine in esame, in risposta ad un lisato di *M. avium*.

La seconda parte dello studio, tutt'ora in corso, è stata condotta su una popolazione adulta di soggetti infetti da NTM. Come fatto per i soggetti pediatrici, è stata investigata con test ELISpot la produzione di IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17 da parte di linfociti T stimolati con antigeni selezionati provenienti dai lisati dalle specie più comuni di NTM (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. kansasii* e *M. bolletii*) e con antigeni di MTB, prima e dopo terapia.

Nell'ultima parte dello studio (ancora preliminare), una parte delle PBMC, provenienti dai soggetti adulti, è stata utilizzata per creare linee T antigene-specifiche (*Micobacterium avium complex* oppure PPD) le quali sono state successivamente nanoingegnerizzate con nanoparticelle di magnetite fluorescenti al fine di creare un sistema di delivery specifico da sfruttare sia a fini diagnostici che terapeutici. Ad ora abbiamo valutato con tecnica citofluorimetrica l'effettivo uptake delle nanoparticelle da parte di questi linfociti e l'eventuale tossicità delle NP su questi ultimi, mediante valutazione della morte cellulare marcando le cellule con ioduro di propidio.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.2 CASISTICA

#### 3.2.1 Casistica soggetti pediatrici

La parte dello studio incentrata sulla popolazione pediatrica ha previsto l'arruolamento di 60 pazienti con età inferiore a 18 anni con linfadenite subacuta o cronica o con diagnosi di linfadenite da infezione con NTM dall'Unità di Malattie infettive, dell'Ospedale Pediatrico Universitario fiorentino Anna Meyer. Sono stati esclusi dallo studio bambini con immunodeficienze congenite o acquisite, con disordini linfoproliferativi o con infezioni da MTB. Per ogni paziente sono stati raccolti e inseriti nel data base i dati demografici e la storia medica passata. A tutti i pazienti è stato effettuato l'esame clinico, TST, un prelievo di sangue venoso per IGRA (Quantiferon-TB-Gold in provetta o QuantiFERON-TB Gold Plus dal settembre 2017), la tipizzazione linfocitaria e la ricerca delle più frequenti cause infettive che portano a linfadenopatia.

Una volta disponibili i campioni derivanti dall'escissione chirurgica o dal drenaggio dei linfonodi, sono stati effettuati test istologici, microscopici, molecolari e colturali per batteri e micobatteri. Nel data base sono stati raccolte anche le informazioni riguardanti il tipo e la durata delle terapie anti-micobatteriche.

I 60 soggetti sono stati così suddivisi:

Gruppo 1 (16 soggetti): Infezione NTM confermata da positività colturale o dei campioni chirurgici.

Gruppo 2 (30 soggetti): Infezione NTM probabile secondo i seguenti criteri:

1. Bambino in precedenza sano
2. Linfadenite unilaterale e senza dolore, di consistenza dura con colorazione viola della pelle sovrastante, assenza di segni e sintomi sistemici
3. Necrosi colliquativa, microcalcificazioni e/o fistolizzazione agli ultrasuoni
4. Negatività dei test sierologici per le cause infettive comuni nei bambini
5. Rigonfiamento  $\geq 5$  mm al tst
6. IGRA negativo
7. Reazione infiammatoria con tessuto di granulazione necrotizzante all'istologia dei campioni chirurgici
8. Risultato negativo alla PCR per *Bartonella henselae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e MTB nelle biopsie chirurgiche

Gruppo 3 (14 soggetti): Bambini con diagnosi alternativa classificati come non infetti.

### 3.1.2 Casistica soggetti adulti

La casistica per la seconda parte dello studio, che è tutt'ora in fase di arruolamento, ha selezionato 15 individui adulti presso l'Unità di Malattie infettive e tropicali dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Careggi diretta dal Prof. Alessandro Bartoloni. La diagnosi dei casi è stata eseguita seguendo le linee guida dell'ATS (American Thoracic Society) e della fondazione IRCCS Ca' Grande dell'ospedale Maggiore Policlinico di Milano, che ha fondato un osservatorio italiano delle infezioni polmonari da NTM: "the Italian REgistry of pulmonary Non-tuberculus mycobactEria (IRENE)". Questo network nasce dal bisogno di uniformità nella diagnosi e trattamento della patologia, infatti, raccoglie in maniera prospettica dati epidemiologici, clinici, radiologici, microbiologici, funzionali, di trattamento e di out-come di pazienti adulti con micobatteriosi. Per giunta, consiglia la redazione del questionario pneumologico del Saint George Hospital ideato per la valutazione dei disturbi respiratori causati da tale infezione [63, 92].

I casi contano 5 individui, 1 maschio e 4 femmine, con età media di 70 anni (range 59-78 anni) e nazionalità italiana. Avevano in comune una sintomatologia che comprende tosse produttiva ed astenia; mentre si manifestava in 2 pazienti calo ponderale, in un paziente fenomeni di emottisi e in un paziente febbricola intermittente (Tab. 4).

ID	Età e sesso	Tosse produttiva	Astenia	Emottisi	Febbricola	Dispnea	Sudorazioni notturne	Calo ponderale
MA 1	68 M	X	X					X
MA 2	78 F	X	X	X				X
MA 3	59 F	X	X	X		X		
MA 4	66 F	X	X				X	X
MA 5	77 F	X	X		X			

**Tabella 4. Sintomatologia dei casi**

L'esame colturale, che prevede almeno un isolamento micobatterico da escreato, biopsia o bronco-lavaggio ha tipizzato i ceppi infettanti che per 3 individui erano *M. avium* e per i 2 restanti *M. intracellulare*. L'esame radiologico rilevava in tutti i candidati un quadro con multiple nodularità ed aree in albero in fiore, in 3 pazienti, inoltre, si potevano distinguere segni di bronchiectasie. La terapia prevedeva l'utilizzo di Etambutolo, Azitromicina e

Rifabutina o Rifampicina (Tab 5). I prelievi ematici da cui sono stati isolati i linfociti, sono stati eseguiti sia prima dell'inizio della terapia che alla guarigione dopo il trattamento. Si sono esclusi casi con immunodeficienze acquisite e con coinfezione da *M. tuberculosis*.

<b>ID</b>	<b>Etambutolo</b>	<b>Azitromicina</b>	<b>Rifabutina</b>	<b>Rifampicina</b>
<b>MA 1</b>	X	X	X	
<b>MA 2</b>	X	X		X
<b>MA 3</b>	X	X		X
<b>MA 4</b>	X	X		X
<b>MA 5</b>	X	X		X

**Tabella 5. Trattamento farmacologico dei casi**

I controlli prevedevano 5 soggetti sani e 5 controlli di malattia, pertanto affetti da tubercolosi attiva (TB).

Gli individui sani, ovvero senza malattie polmonari diagnosticate né colonizzazione da micobatteri non tubercolari, erano 1 maschio e 4 femmine, con età media di 51 anni (range 36-62 anni).

I controlli di TB comprendevano 3 maschi e 2 femmine, con età media di 63 anni (range 49-71 anni). I segni clinici manifestati erano febbre alta, tosse produttiva e calo ponderale. Mentre l'esame microbiologico prevede almeno un isolamento del ceppo *M. tuberculosis* da campioni di escreato o bronco-lavaggio, l'esame radiologico evidenziava addensamenti parenchimali, versamento pleurico in 3 pazienti e bronchiectasie. Il prelievo è stato eseguito nel paziente con tubercolosi ancora attiva e con l'esclusione di coinfezioni da NTM.

### **3.2 ISOLAMENTO DI PBMCS DA SANGUE PERIFERICO**

Dai campioni di sangue prelevati da ciascuno dei soggetti arruolati sono state isolate le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCS). A tal fine il sangue è stato stratificato su gradiente di densità Ficoll-Hypaque Lymphoprep™, (STEMCELL™ Technologies, Canada) e centrifugato a 2500 rpm per 25', a temperatura ambiente, senza freno. Una volta recuperato l'anello di PBMCS, questo viene lavato due volte con soluzione fisiologica (B-Braun, Germania, NaCl 0,9%) o con DPBS (EuroClone, Italia), centrifugando a 1500 rpm per 10 minuti, con freno. Successivamente le cellule sono state contate utilizzando la camera di Burker e poi risospese in terreno RPMI 1640 (Biochrom, Leonorenstr, Berlin) completo,

cioè addizionato con L-glutammina 1% (EuroClone, Italia),  $\beta$ -mercaptoetanololo 1% (Sigma-Aldrich, USA), Na piruvato 1% (Gibco, Life Technologies, USA), aminoacidi non essenziali 1% (Gibco, Life Technologies, USA) e penicillina 50.000U/streptomicina 50mg (PAN Biotech GmbH, Germania), con il 10% di siero bovino fetale, in modo da avere una concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule/ml.

### **3.3 ANTIGENI BATTERICI**

Gli antigeni dei ceppi d'interesse sono stati ottenuti a partire da colture cellulari cresciute su terreno Middlebrook 7h11 con pH 6,6. Il nostro protocollo di tesi prevede l'utilizzo di antigeni secreti nel brodo di coltura e antigeni intracellulari prodotti dai tipi batterici selezionati. Allo sviluppo delle linee, le colture si prelevano e si centrifugano per 15 minuti a 3000 rpm, si raccoglie il supernatante che contiene gli antigeni sospesi secreti dalle cellule nel brodo di coltura e si incuba a  $95^{\circ}\text{C}$  per 2 ore. Invece, le cellule vengono risospese in 500  $\mu\text{l}$  di DPBS sterile in cui si introducono 100 $\mu\text{l}$  di biglie di zircone (da 0,1 a 0,5 mm di diametro) e a questo punto la soluzione viene distribuita in Eppendorf posizionate nel beadbeater (Biospec Products, Bartleville, USA) dove avverrà la lisi cellulare. Questo strumento viene comunemente utilizzato per la distruzione di sospensioni acquose di lieviti, funghi e batteri. La lisi cellulare ha un'efficienza del 95% con 10-80 gr di cellule. Insieme a questo vengono utilizzate biglie di vetro o zircone di diametro da 0,1 a 1 mm, viene preferito questo range perché dimensioni superiori non permetterebbero una corretta agitazione. Successivamente i lisati cellulari vengono centrifugati per 15 minuti a 3000 rpm, si preleva il supernatante che contiene gli antigeni intracellulari e si incuba a  $95^{\circ}$  per 2 ore. Infine, i campioni inattivati sono stoccati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4 SAGGIO BRADFORD: QUANTIFICAZIONE DEI LISATI**

#### **MICOBATTERICI**

Il saggio di Bradford permette la quantificazione proteica mediante l'utilizzo del colorante Coomassie Brilliant Blue G250 (Bio-Rad Laboratories, California, USA) che si lega agli amminoacidi basici presenti sulle proteine da quantificare determinando lo spostamento del picco massimo di assorbimento dal rosso cioè 465 nm, al blu, 595 nm, in soluzioni acide. Per quantificare le proteine nei nostri campioni di lisato batterico e antigeni escreti, si prepara una curva di taratura con albumina da siero bovino (BSA). Partendo da una concentrazione (primo punto della curva, A) di 1 mg/ml, si effettuano diluizioni seriali 1:2 per ottenere una colonna di diluiti standard:

- A (1mg/ml)
- B (0,5 mg/ml)
- C (0,25 mg/ml)
- D (0,125 mg/ml)
- E (0,06 mg/ml)
- F (0,03 mg/ml)
- G (0,015 mg/ml)
- H (0,007 mg/ml) Bianco (solo solvente)

Nella piastra a 96 pozzi si introducono 10 µl di standard in doppio, pozzi bianco e campioni. Si aggiungono a ciascun pozzo 200 µl di Coomassie brilliant blue, diluito 1:5 e si mette la piastra al buio per 5 minuti. Infine, si procede con la lettura allo spettrofotometro (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) a 595 nm. Una volta calcolata la curva di taratura si procede ad interpolare la densità ottica dei campioni per dedurne la concentrazione proteica lavorando su grafico in file Excel con linea di tendenza polinomiale di ordine 4.

### **3.5 TEST ELISpot**

Una parte delle PBMCs isolate dal sangue periferico sono state utilizzate per l'esecuzione del test ELISpot (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden) per determinare la produzione di IL-2, IL-17 e IFN- $\gamma$ . Per ciascun paziente e per ciascuna delle tre citochine testate, sono state seminate in un pozzo di una piastra a 96 pozzetti rivestiti con anticorpi anti-IL-2 o anti-IL-17 o anti IFN- $\gamma$ ,  $2 \times 10^5$  cellule/pozzo, in duplicato. Alle cellule è stato poi aggiunto solo terreno di coltura (controllo negativo), terreno contenente lisato (solo *Mycobacterium avium complex* per i soggetti pediatrici, *Mycobacterium avium complex*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. abscessus* e *M. boletii* per gli adulti, ciascuno ad una concentrazione di 10 µg/ml;) oppure terreno contenente l'anticorpo monoclonale anti-CD3 (1µg/ml), che attiva i linfociti t in maniera aspecifica, come controllo positivo. Solo per i soggetti adulti inoltre è stato piastrato terreno contenente i classici antigeni tubercolari BCG, ESAT-6, CFP-10, Ala-DH, PPD, MAP e MUL come controllo di tubercolosi. Le cellule sono state quindi poste in un incubatore umidificato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 24h nel caso di ELISpot per IL-2 e IFN- $\gamma$ , per 48h nel caso di ELISpot per IL-17.

Al termine del periodo di coltura, le piastre sono state lavate ed incubate per 2h con il relativo anticorpo di rilevazione (IL-2-II-biotin, MT-504-biotin, 7-B6-1-biotin). Successivamente è stata aggiunta la streptavidina per 2h ed in seguito la soluzione substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina. Le piastre sono state poi incubate per 10 minuti a temperatura ambiente, al buio, finchè gli spot non sono diventati visibili. Una volta stoppata la reazione le piastre sono state fatte asciugare. Il numero di cellule formanti spot (SFCs) sono state contate utilizzando un lettore automatico ELISpot, usando il software AID ELISpot versione 3.2.3. I risultati sono stati espressi in SFCs per milione di PBMCs. La media delle SFCs contate nel controllo negativo è stata sottratta dalla media rilevata nei pozzi con il lisato.

### **3.6 INDUZIONE DI LINEE LINFOCITARIE ANTIGENE SPECIFICHE**

Una parte delle PBMCs ottenute dal sangue dei 5 pazienti adulti affetti da micobatteriosi e dei 5 pazienti adulti affetti da tubercolosi attiva sono state utilizzate per indurre delle linee antigene specifiche.

Le PBMCs di ciascun paziente sono state risospese in terreno RPMI 1640 completo (come descritto sopra) addizionato con il 5% di siero umano (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) e piastrate ad una concentrazione di  $1,5 \times 10^6$  cellule/2 ml/pozzo in duplicato. Alle colture provenienti dal sangue dei 5 pazienti affetti da micobatteriosi (3 da *M. Avium*, 2 da *M. intracellulare*) è stato aggiunto il lisato di *Mycobacterium avium complex* (10 µg/ml), alle colture provenienti dai 5 pazienti con tubercolosi attiva è stata aggiunta PPD (10 µg/ml). Le PBMCs sono state tenute in coltura per 5 giorni e al giorno 6, ed in seguito ogni 3 giorni, è stata aggiunta rIL-2 (20 U/ml) (PeproTech, Cranbury, New Jersey) per favorire l'espansione dei linfociti T attivati da ciascun antigene.

### **3.7 VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITA' DELLE LINEE CELLULARI T OTTENUTE**

Al giorno 15 linee cellulari ottenute sono state testate per la loro specificità verso gli antigeni di *Micobacterium Avium complex* oppure PPD prima di essere utilizzate per la nanoingegnerizzazione. A tal fine le  $10^5$  cellule/pozzo sono state piastrate in triplicato in una piastra a 96 pozzi con fondo a U, in presenza di solo terreno di coltura (controllo negativo), terreno di coltura e PHA (controllo positivo) (Gibco, Life Technologies, USA) oppure terreno di coltura e lisato di *Micobacterim avium complex* oppure PPD e dopo 72h sono state raccolte dalla piastra. 18 ore prima della raccolta è stato aggiunto a ciascun pozzo 0,5µCi di [<sup>3</sup>H]-timidina (Amersham Pharmacia Biotech, Cologno Monzese, Italy). L'incorporazione

del radionuclide è stata misurata con un  $\beta$ -counter ed è stato calcolato l'indice mitogenico (MI) facendo il rapporto tra le conte per minuto (cpm) ottenute dalle colture in cui era presente l'antigene e le cpm ottenute dalle colture con solo terreno di coltura. Un indice mitogenico  $> 5$  è stato considerato come positivo.

### **3.8 NANOINGEGNERIZZAZIONE DELLE LINEE LINFOCITARIE T ANTIGENE SPECIFICHE E VALUTAZIONE DELL'UPTAKE E DELLA VITALITA' DELLE LINEE NANOINGEGNERIZZATE**

Le linee linfocitarie T antigene specifiche sono state ingegnerizzate con nanoparticelle di magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sulla cui superficie è stato legato un fluorocromo (FITC) (Colorobbia, Vinci, Italia).

A questo scopo  $10^6$  cellule, di ciascuna linea linfocitaria, in duplicato, sono state poste in coltura in 1 ml di terreno contenente diverse concentrazioni di nanoparticelle di magnetite (0,5-0,05-0,005 ppm), oppure solo terreno di coltura come controllo negativo (//), per diversi time points (2h, 6h, 18h, 24h).

Allo scadere di ciascun time point e dopo aver effettuato 2 lavaggi per eliminare le nanoparticelle rimaste in sospensione, alle cellule T antigene specifiche nanoingegnerizzate è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica (FACSCanto, BD Biosciences) per la valutazione dell'uptake delle nanoparticelle fluorescenti e per la valutazione della vitalità mediante marcatura con ioduro di propidio (PI) (eBioscience, Eysseneckstraße, Germania). Per una più corretta analisi delle popolazioni cellulari è stata operata una marcatura con fluorocromo anti-CD3 (BioLegend, San Diego, CA,US).

### **3.9 ANALISI STATISTICA**

Per il calcolo di frequenze assolute e percentuali dei dati qualitativi è stata utilizzata la statistica descrittiva così come per il calcolo di media, mediana, IQR e deviazione standard dei dati quantitativi. Le distribuzioni dei dati sono state comparate valutando la loro normalità mediante il valore di asimmetria, con test T di Student o test di Mann-Whitney per dati indipendenti, con il test di Wilcoxon per i dati dipendenti.

L'accuratezza, in termini di sensibilità (capacità del test di identificare i soggetti veri positivi) e specificità (capacità del test di identificare i soggetti veri negativi) del test ELISpot per IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17 è stata valutata per ciascun antigene mediante curva ROC (Receiving Operating Characteristic). L'accuratezza del test è proporzionale all'area sotto la curva (AUC) e può assumere un valore da 0,5 (50%) e 1 (100%). Secondo la classificazione

proposta da Swets il test non è accurato per  $AUC = 0,5$ , il test è scarsamente accurato per  $0,5 < AUC \leq 0,7$ , il test è moderatamente accurato per  $0,7 < AUC \leq 0,9$ , il test è altamente accurato per  $0,9 < AUC < 1$  e il test è perfetto per  $AUC = 1$  [93]. In fine, per identificare il miglior cutoff che massimizzi sensibilità e specificità per ciascun antigene, è stato calcolato il Youden's index (= Sensibilità - [1 - Specificità]). L'analisi statistica è stata effettuata con il software >SPSS per Windows, versione 25.0. Una  $p < 0,05$  è considerata statisticamente significativa.

## 4. RISULTATI

### 4.1 RISULTATO TEST ELISPOT PAZIENTI PEDIATRICI

I risultati del test ELISpot per le citochine IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17, effettuati utilizzando il lisato di *M. Avium* sono riassunti nelle figure 5, 6 e 7. Per la citochina IL-2 è stato rilevato un valore medio significativamente più alto nel gruppo 1 rispetto al gruppo 2 ( $p = 0,015$ ), nel gruppo 1 rispetto al gruppo 3 ( $p < 0,001$ ) e nel gruppo 2 rispetto al gruppo 3 ( $p=0,004$ ).

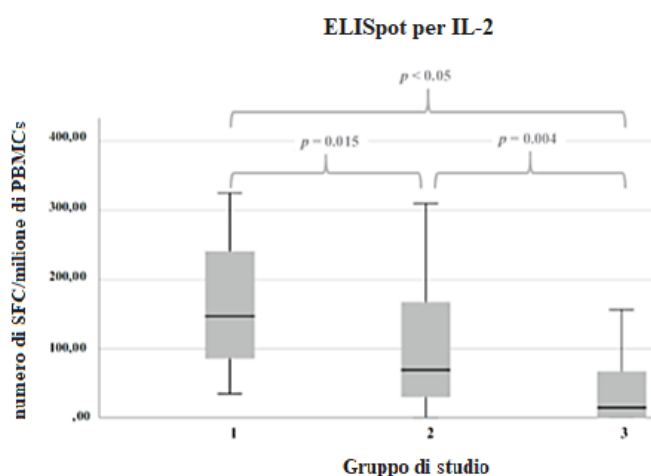


Figura 5. Risultato ELISpot per IL-2

I risultati dell'ELISpot per IFN- $\gamma$  erano significativamente più alti nel gruppo 2 rispetto al gruppo 3 ( $p=0,010$ ), mentre non vi erano differenze significative tra il gruppo 1 e il gruppo 3.

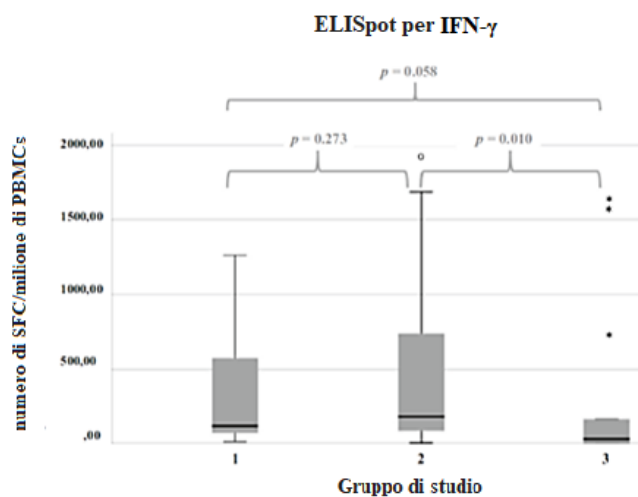
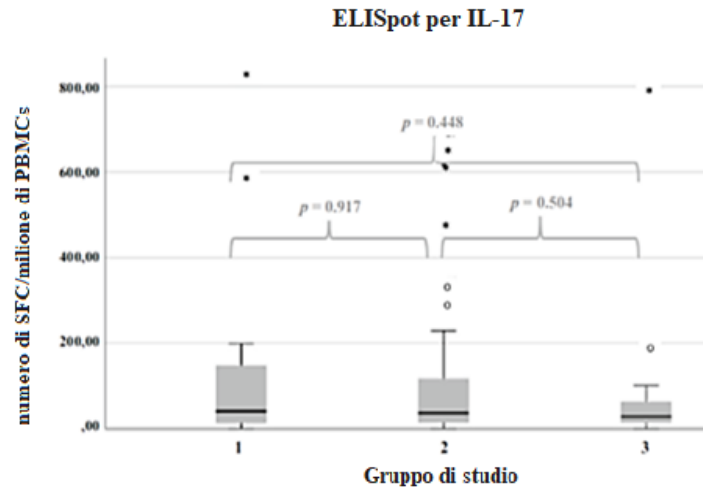


Figura 6. Risultato ELISpot per IFN- $\gamma$



**Figura 7. Risultato ELISpot per IL-17**

Le differenze di produzione di IL-17 non erano significativamente differenti in nessuno dei tre gruppi.

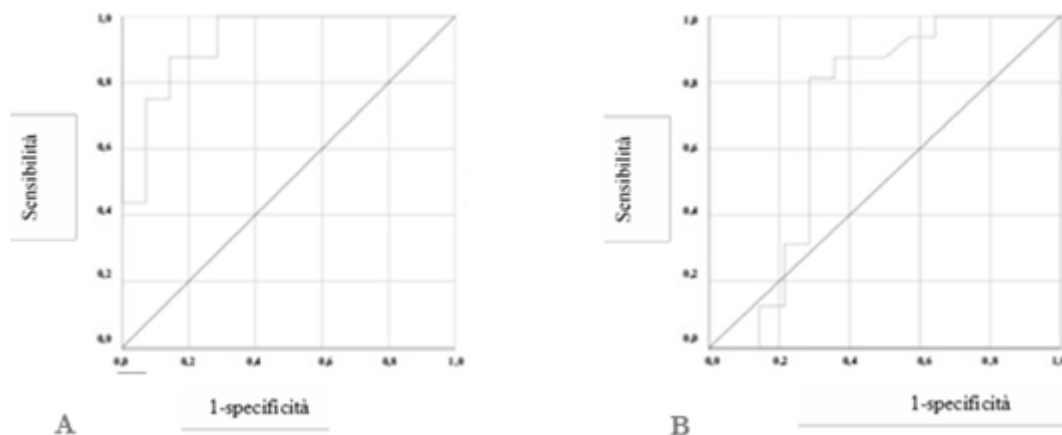
Confrontando i bambini con linfadenopatia da NTM probabile o confermata (gruppo 1 e gruppo 2) con i bambini con infezione altra da NTM (gruppo 3), si trovano risultati significativi nei test ELISpot basati su IFN- $\gamma$  e IL-2 (rispettivamente  $p < 0,001$ ,  $p = 0,010$ ), mentre nessuna differenza in IL-17. Nel gruppo 1, 4 pazienti risultano avere un'infezione da NTM non appartenente alla specie *M. avium*, il valore medio e IQR per i test ELISpot di IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17 erano rispettivamente 380,3 (85,5-734,25), 113,4 (92,9-149,2), 31,2 (19,5-57,3). La loro inclusione nel gruppo 1 non ha nessun impatto sui risultati statistici nel test ELISpot per IL-2 e IFN- $\gamma$  e IL-17 perché sono distribuiti eterogeneamente come riportato nella Tabella 6.

Considerando la risposta del test ELISpot di IL-2 per i lisati di *M. avium*, le analisi ROC mostrano una sensibilità del 87,5% e una specificità del 85,7% confrontando il gruppo 1 e il gruppo 3, per un cutoff di 68,9 SCF per milione PBMCs. L'area sotto la curva ROC è dello 0,924 (95% IC 0,828-1,00) (Figura 8A).

I risultati del test ELISpot per IFN- $\gamma$  risultano essere più scarsi. La sensibilità e la specificità tra il gruppo 1 e 3 sono rispettivamente 81,3% e 71,4%, per un valore soglia di 63,4 SCF per milione PBMCs. L'area sotto la curva ROC risulta essere dello 0,703 (95% IC 0,490-0,916) (Figura 8B).

Lisati <i>M. avium</i>	Infetti NTM (probabili e confermati, esclusi NTM “non- <i>M. avium</i> ”) (n=42)	Non infetti NTM (n=14)	p
Media ELISpot IL-2 (IQRs)*	91,0 (35,62-186,44)	14,5 (2,0-58,6)	<0,001
Media ELISpot IFN- $\gamma$ (IQRs)*	157,5 (82,0-603,75)	33,7 (4,0-140,0)	0,009
Media ELISpot IL-17 (IQRs)*	40,62 (13,12-149,05)	27,5 (12,5-57,2)	0,412

**Tabella 6. Risultati del test ELISpot IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17 con lisati *M. avium* in bambini con infezioni NTM (esclusi i non *M. avium* NTM) e non infetti. (\*i risultati sono espressi come media e range interquartile di cellule formanti spot (SCF) per milione di PBMCs)**



**Figura 8. Curve ROC (receiver operator characteristic) dei risultati ELISpot di IL-2 (A) e IFN- $\gamma$  (B) confrontando bambini infetti (n=16) con bambini non infetti (n=14).**

Si osserva un peggior risultato del test ELISpot per IL-17 con antigeni provenienti da lisati di *M. avium*. Le analisi ROC dimostrano 50% di sensibilità e 71,4 % di specificità confrontando il gruppo 1 e il gruppo 3, per un cutoff del 42,67 SCF per milione PBMCs. L'area sotto la curva ROC si dimostra dello 0,583 (95% IC 0.374-0.791).

Inoltre, le analisi ROC tra il gruppo 1, senza contare i risultati degli individui non-*M. avium*, e il gruppo 3, mostrano, nel test ELISpot per IL-2, il 91,7% di sensibilità e 85,7% di

specificità, con una soglia di 63,4 SFC per milione PBMCs, nel test ELISpot IFN- $\gamma$ , 83,3% di sensibilità e 71,4% di specificità, per un cutoff del 63,4 SFC per milione PBMCs. Mentre nel test ELISpot IL-17, 58,3% di sensibilità e 71,4% di specificità, con un cutoff del 63,4 SFC per milione PBMCs.

Confrontando i risultati del test ELISpot per IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17 con i lisati di *M. avium* dei bambini del gruppo 1 e gruppo 2, le differenze più significative sono state riscontrate rispetto il tempo d'insorgenza dei segni clinici. In particolare, i risultati dei test ELISpot per IL-2 sono decisamente più alti in pazienti che in cui la malattia è insorta prima di 3 mesi rispetto a chi è stato testato prima di tale tempistica ( $p=0,001$ ). Al contrario, i risultati del test ELISpot per IFN- $\gamma$  si dimostrano più alti in bambini che eseguono il test prima di aver compiuto 3 mesi di insorgenza della linfoadenopatia ( $p=0,025$ ). Mentre nessuna differenza significativa si nota nei risultati del test ELISpot per IL-17 nei soliti sottogruppi ( $p=0,260$ ) (Tabella 7).

<b>Lisati <i>M. avium</i></b>	<b>Bambini testati con meno di 3 mesi di linfoadenopatie (n=13)</b>	<b>Bambini testati con più di 3 mesi di linfoadenopatia (n=33)</b>	<b>p</b>
<b>Media ELISpot IL-2 (IQRs)*</b>	87,5 (36,2-138,8)	97,1 (41,2-211,0)	0,001
<b>Media ELISpot IFN- <math>\gamma</math> (IQRs)*</b>	415,4 (84,5-1042,3)	149,6 (77,5-513,7)	0,025
<b>Media ELISpot IL-17 (IQRs)*</b>	30,0 (2,5-86,2)	43,7 (17,5-202,1)	0,260

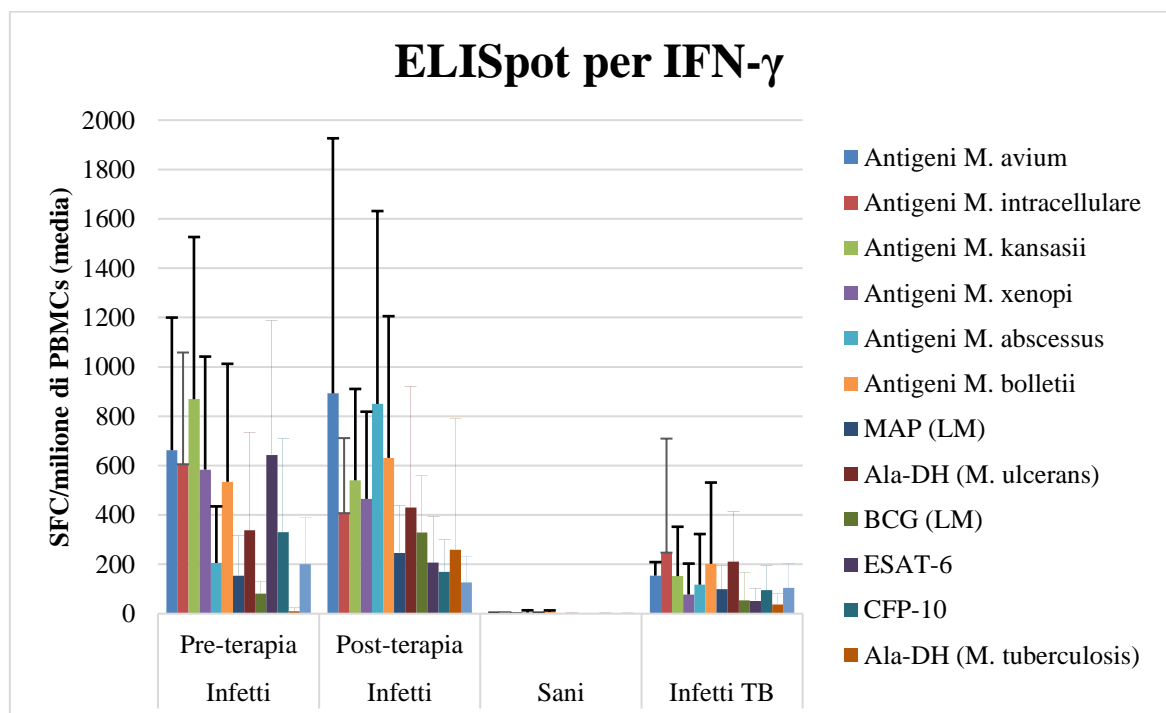
**Tabella 7. Risultati dei test ELISpot per IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17 con lisati di *M. avium* in infezioni probabili o certe da NTM in bambini, rispetto al tempo d'insorgenza dei sintomi ed al test di studio. (\*i risultati sono espressi come media e range interquartile di cellule formanti spot (SCF) per milione di PBMCs)**

Per di più i risultati dei test ELISpot basati su IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17 non hanno notevoli differenze in bambini del gruppo 1 e 2 ai quali è stata somministrata una terapia antimicobatterica prima dello studio rispetto a chi non è stata fornita (rispettivamente,  $p=0,690$ ,  $p=0,131$ ,  $p=0,972$ ,). Infine, non si sono riscontrate differenze nei risultati dei test ELISpot per IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-17 in bambini che necessitano di un ulteriore intervento chirurgico

rispetto a chi si è sottoposto all'escissione solo una volta. (rispettivamente,  $p=0,239$ ,  $p=0,802$ ,  $p=0,294$ ).

## 4.2 RISULTATO TEST ELISPOT PAZIENTI ADULTI

I risultati dello studio pilota per indagare la produzione di IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17 su un gruppo di 5 adulti NTM infetti rispetto a controlli sani e controlli di malattia (con infezione da MTB) sono di seguito riportati per ciascun antigene testato e per ciascun gruppo (Figura 9, Figura 11, Figura 13).



**Figura 9. Risultato ELISpot per IFN- $\gamma$**

Indagando la presenza di risposte significativamente diverse ai vari antigeni testati (Tabella 8) in termini di produzione di IFN- $\gamma$  si può notare che confrontando il gruppo dei pazienti infetti (sia pre- che post-terapia) rispetto ai soggetti sani, tutti gli antigeni di NTM danno differenze significative, eccetto *M. bolletii* e Ala-DH di *M. ulcerans*. Gli stessi soggetti NTM infetti rispondono diversamente anche agli antigeni tubercolari ESAT-6 e CFP-10 utilizzati come tool diagnostico nei test IGRA, rispondono anche a BCG mentre non in modo significativamente diverso alla PPD e ad Ala-DH di MTB.

I soggetti infetti da *M. tuberculosis* hanno risposte del test per IFN- $\gamma$  paragonabili a quelle dei pazienti infetti da NTM per quanto riguarda tutti gli antigeni di MTB e tutti gli antigeni

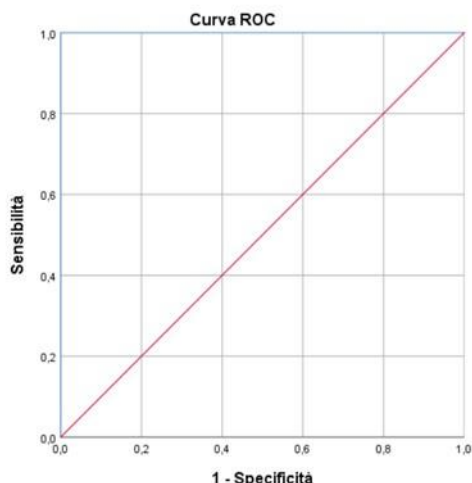
di NTM, eccetto per *M. xenopi* e BCG, ove la risposta è significativamente maggiore nei soggetti NTM infetti.

	<b>Sani vs Infetti</b>	<b>Sani vs Infetti</b>	<b>TB vs Infetti</b>	<b>TB vs Infetti Post-terapia</b>
<i>M. avium</i>	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>	0,107	0,187
<i>M. intracellulare</i>	<b>0,041</b>	<b>0,040</b>	0,151	0,310
<i>M. kansasii</i>	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>	0,070	0,083
<i>M. xenopi</i>	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>	<b>0,016</b>	<b>0,032</b>
<i>M. abscessus</i>	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>	0,421	0,151
<i>M. bolletii</i>	0,069	0,072	0,151	0,095
MAP (LM)	<b>0,008</b>	<b>0,048</b>	0,535	0,310
Ala-DH ( <i>M. ulcerans</i> )	0,132	0,124	0,550	0,690
BCG (LM)	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>	0,143	<b>0,048</b>
ESAT-6	<b>0,008</b>	<b>0,048</b>	0,073	0,134
CFP-10	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>	0,242	0,343
Ala-DH ( <i>M. tuberculosis</i> )	0,444	0,167	0,135	0,833
PPD	0,081	0,054	0,359	0,740

**Tabella 8. Significatività statistica del confronto fra i vari gruppi di pazienti testati con ELISpot per IFN- $\gamma$  prodotto in risposta allo stimolo antigenico sui linfociti T dei pazienti in studio. In grassetto le differenze statisticamente significative.**

Le analisi ROC per gli antigeni di NTM che valutati per la loro induzione di produzione di IFN- $\gamma$  hanno dato una differenza significativa nel confronto fra gruppo dei sani rispetto a quello degli infetti dimostrano un'area sotto la curva pari a 1 (test perfetto, con il 100% di sensibilità e specificità) per tutti gli antigeni di NTM analizzati (Figura 10), eccetto che per MAP (LM) che dimostra una AUC=0,33 (test non accurato).

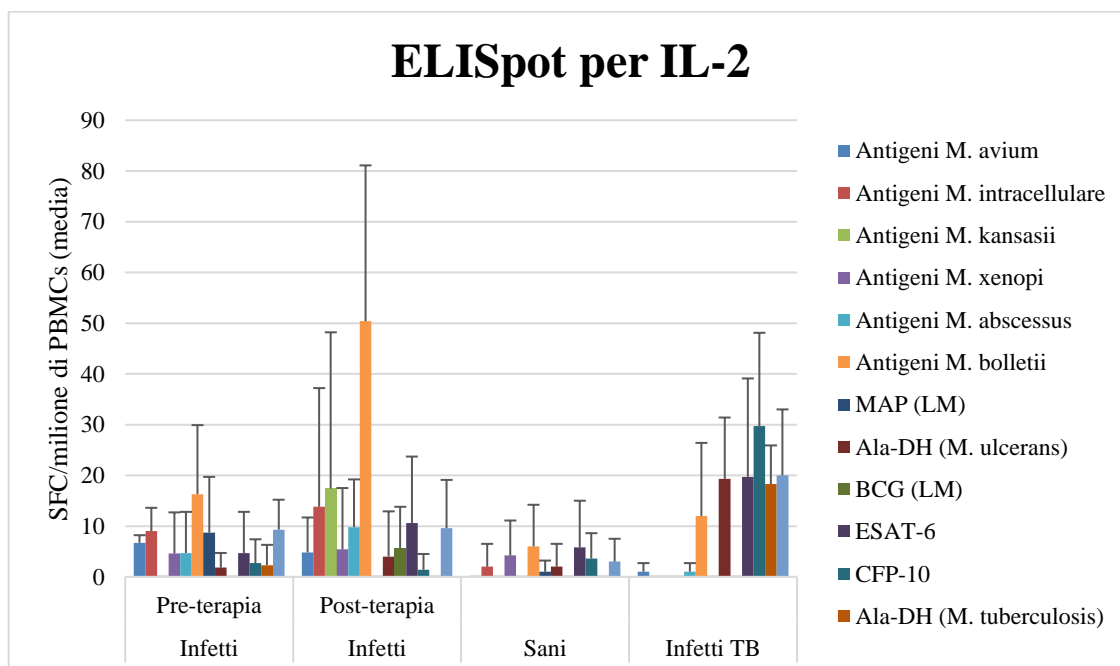
I cutoff calcolati con indice di Youden (SFC/milione di PBMCs) sono 74,5 per *M. avium*, 44,5 per *M. intracellulare*, 31,5 per *M. kansasii*, 50,5 per *M. xenopi* e 6,5 per *M. abscessus*.



**Figura 10. Curva ROC (receiver operator characteristic) dei risultati ELISpot di IFN- $\gamma$  (B) confrontando adulti infetti (n=5) con adulti non infetti (n=5).**

La valutazione statistica del test ELISpot per IL-2 per tutti gli antigeni NTM testati (Figura 11) ci dimostra differenze significative solo per *M. avium* nel confronto fra sani e infetti pre-terapia e per *M. abscessus* e *M. bolletii* nel confronto fra sani e infetti post-terapia.

I soggetti NTM infetti pre-terapia hanno differenze significative con i malati di tubercolosi per *M. avium*, *M. intracellulare* e Ala-DH (MTB); differenze significative fra NTM infetti post-terapia e malati tubercolari si riscontrano solo per CFP-10 e Ala-DH (MTB).



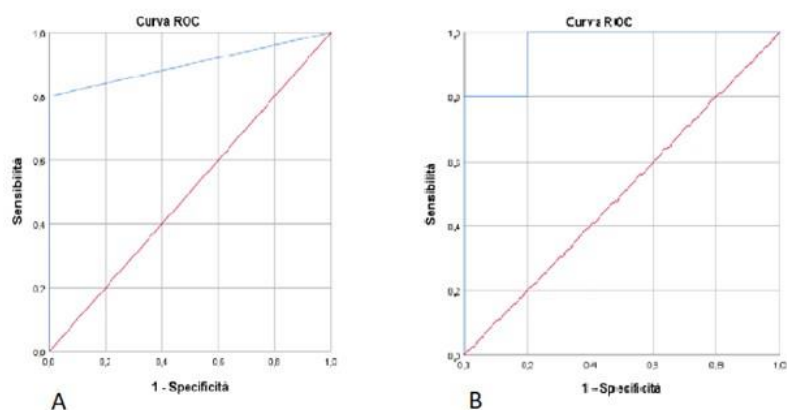
**Figura 11. Risultato ELISpot per IL-2**

	Sani vs Infetti Pre-terapia	Sani vs Infetti Post-terapia	TB vs Infetti Pre-terapia	TB vs Infetti Post-terapia
<i>M. avium</i>	<b>0,018</b>	0,444	<b>0,014</b>	0,297
<i>M. intracellulare</i>	0,125	0,444	<b>0,037</b>	0,464
<i>M. kansasii</i>	1	0,167	1	0,286
<i>M. xenopi</i>	0,938	1	0,317	1
<i>M. abscessus</i>	0,375	<b>0,048</b>	0,517	0,104
<i>M. bolletii</i>	0,323	<b>0,030</b>	0,750	0,055
BCG (LM)	1	0,444	1	0,464
ESAT-6	0,863	0,523	0,314	0,524
CFP-10	0,800	0,444	0,119	<b>0,018</b>
Ala-DH ( <i>M. tuberculosis</i> )	0,375	1	<b>0,048</b>	<b>0,018</b>
PPD	0,194	0,213	0,292	0,307
MAP (LM)	0,375	1	0,121	1
Ala-DH ( <i>M. ulcerans</i> )	1	1	0,120	0,125

**Tabella 9. Significatività statistica del confronto fra i vari gruppi di pazienti testati con ELISpot per IL-2 prodotta in risposta allo stimolo antigenico sui linfociti T dei pazienti in studio. In grassetto le differenze statisticamente significative.**

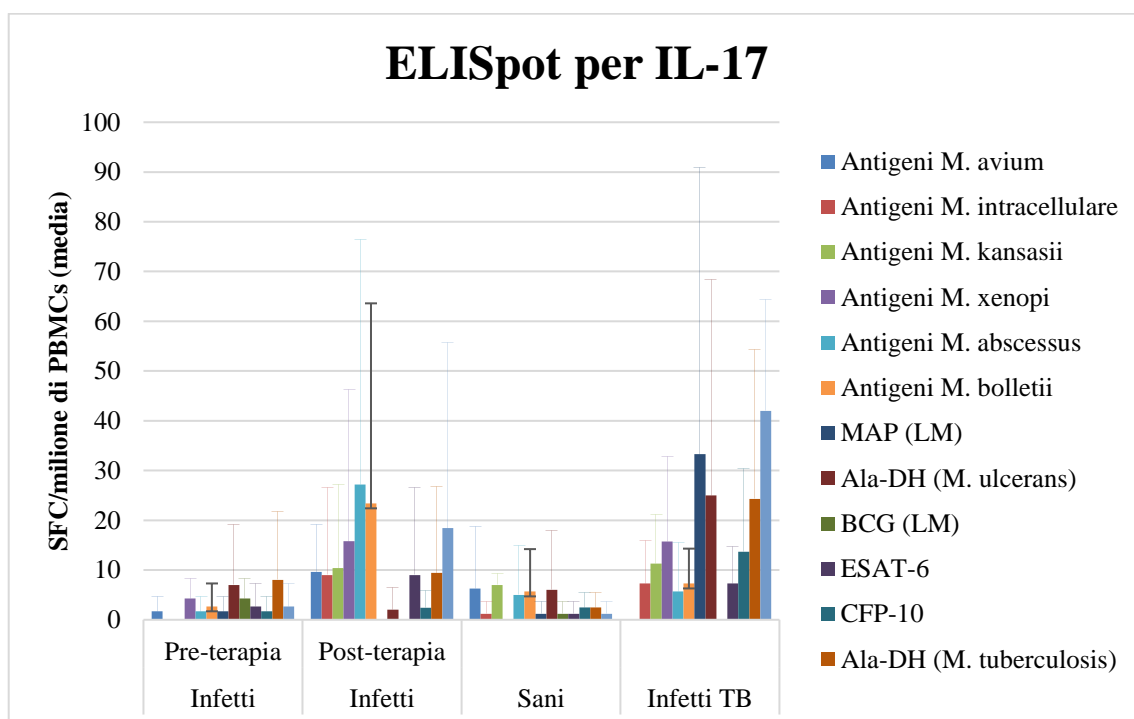
L'analisi ROC per *M. avium* valutata per la produzione di IL-2 fra gruppo dei sani rispetto a quello degli infetti pre-terapia ha dimostrato una AUC=1 con il 100% di specificità e sensibilità con un cut-off di 2,5 SFC/milione di PBMCs.

La stessa analisi fra sani e pazienti NTM infetti post-terapia dimostra un'area sotto la curva pari a 0,9 per *M. abscessus* con 80% di sensibilità e 100% di specificità ad un cutoff di 2,5 SFC/milione di PBMCs; AUC= 0,96 per *M. bolletii* con 100% di sensibilità e 80% di specificità ad un cutoff di 6 SFC/milione di PBMCs (Figura 12).



**Figura 12. Curva ROC (receiver operator characteristic) dei risultati ELISpot di IL-2 confrontando adulti infetti post-terapia (n=5) con adulti non infetti (n=5) per *M. abscessus* (A) e *M. bolletii* (B).**

Il test ELISpot per IL-17 ha dato differenze significative solamente nel confronto fra sani e soggetti NTM infetti pre-terapia relativamente all'antigene *M. kansasii* (Tabella 10) per il quale si ottiene una curva ROC con AUC=1 con un cut-off di 2,5 SFC/milione di PBMCs.



**Figura 13. Risultato ELISpot per IL-17**

	<b>Sani vs Infetti Pre-</b>	<b>Sani vs Infetti Post-terapia</b>	<b>TB vs Infetti Pre-</b>	<b>TB vs Infetti Post-terapia</b>
<i>M. avium</i>	0,524	0,675	1	0,286
<i>M. intracellulare</i>	1	0,841	0,400	0,821
<i>M. kansasii</i>	<b>0,029</b>	0,492	0,400	0,732
<i>M. xenopi</i>	0,143	0,444	0,371	0,643
<i>M. abscessus</i>	0,565	0,302	0,559	0,554
<i>M. boletii</i>	0,567	0,437	0,399	1
<b>BCG (LM)</b>	0,325	0,444	0,400	1
<b>ESAT-6</b>	0,665	0,841	0,421	0,554
<b>CFP-10</b>	0,723	0,963	0,340	0,364
<b>Ala-DH (<i>M. tuberculosis</i>)</b>	0,565	0,841	0,525	0,375
<b>PPD</b>	0,665	0,563	0,087	0,232
<b>MAP (LM)</b>	0,851	0,444	0,442	0,375
<b>Ala-DH (<i>M. ulcerans</i>)</b>	0,918	0,722	0,551	0,732

**Tabella 10. Significatività statistica del confronto fra i vari gruppi di pazienti testati con ELISpot per IL-17 prodotta in risposta allo stimolo antigenico sui linfociti T dei pazienti in studio. In grassetto le differenze statisticamente significative**

#### **4.3 INDICE MITOGENICO DELLE LINEE *Micobacterium Avium Complex*-SPECIFICHE E PPD-SPECIFICHE**

Dalle PBMCs ottenute dal sangue periferico di 10 soggetti adulti arruolati nello studio, sono state indotte linee di cellule T antigene-specifiche; 3 soggetti (MA1, MA2, MA3) erano risultati positivi per infezione da *M. avium*, 2 soggetti (MA4 e MA5) erano risultati positivi per infezione da *M. intracellulare*. Per le PBMCs di tutti questi 5 pazienti è stato utilizzato il lisato di MAC per l'induzione delle linee specifiche. Altri 5 soggetti presentavano tubercolosi attiva (TB1, TB2, TB3, TB4, TB5); per le PBMCs di questi soggetti è stata utilizzata la PPD come antigene stimolante. La valutazione della specificità delle linee ottenute è stata effettuata mediante un test di proliferazione a 3 giorni e gli indici mitogenici (MI) ottenuti sono riassunti nelle tabelle 11, 12. Tutte le linee indotte hanno risposto positivamente allo stimolo antigenico specifico.

<b>SOGGETTO</b>	<b>MA1</b>	<b>MA2</b>	<b>MA3</b>	<b>MA4</b>	<b>MA5</b>
<b>MI</b>	9,02	27,25	13,21	5,90	17,88

**Tabella 11. Indice mitogenico delle linee cellulari T MAC-specifiche**

<b>SOGGETTO</b>	<b>TB1</b>	<b>TB2</b>	<b>TB3</b>	<b>TB4</b>	<b>TB5</b>
<b>MI</b>	14,87	32,07	10,59	8,81	15,54

**Tabella 12. Indice mitogenico delle linee cellulari T PPD-specifiche**

#### **4.4 VALUTAZIONE DELL'UPTAKE DELLE NP MAGNETICHE FLUORESCENTI DA PARTE DELLE LINEE-ANTIGENE-SPECIFICHE**

Le linee cellulari T antigene-specifiche sono state poste in coltura per vari time points (2h, 6h, 18h, 24h) a varie concentrazioni di NP magnetiche fluorescenti (0,5 ppm, 0,05 ppm, 0,005 ppm). Allo scadere di ciascun time point, dopo opportuni lavaggi, abbiamo valutato l'uptake delle nanoparticelle da parte dei linfociti T antigene-specifici, analizzando il picco di fluorescenza FITC (delle nanoparticelle) sulla popolazione CD3+.

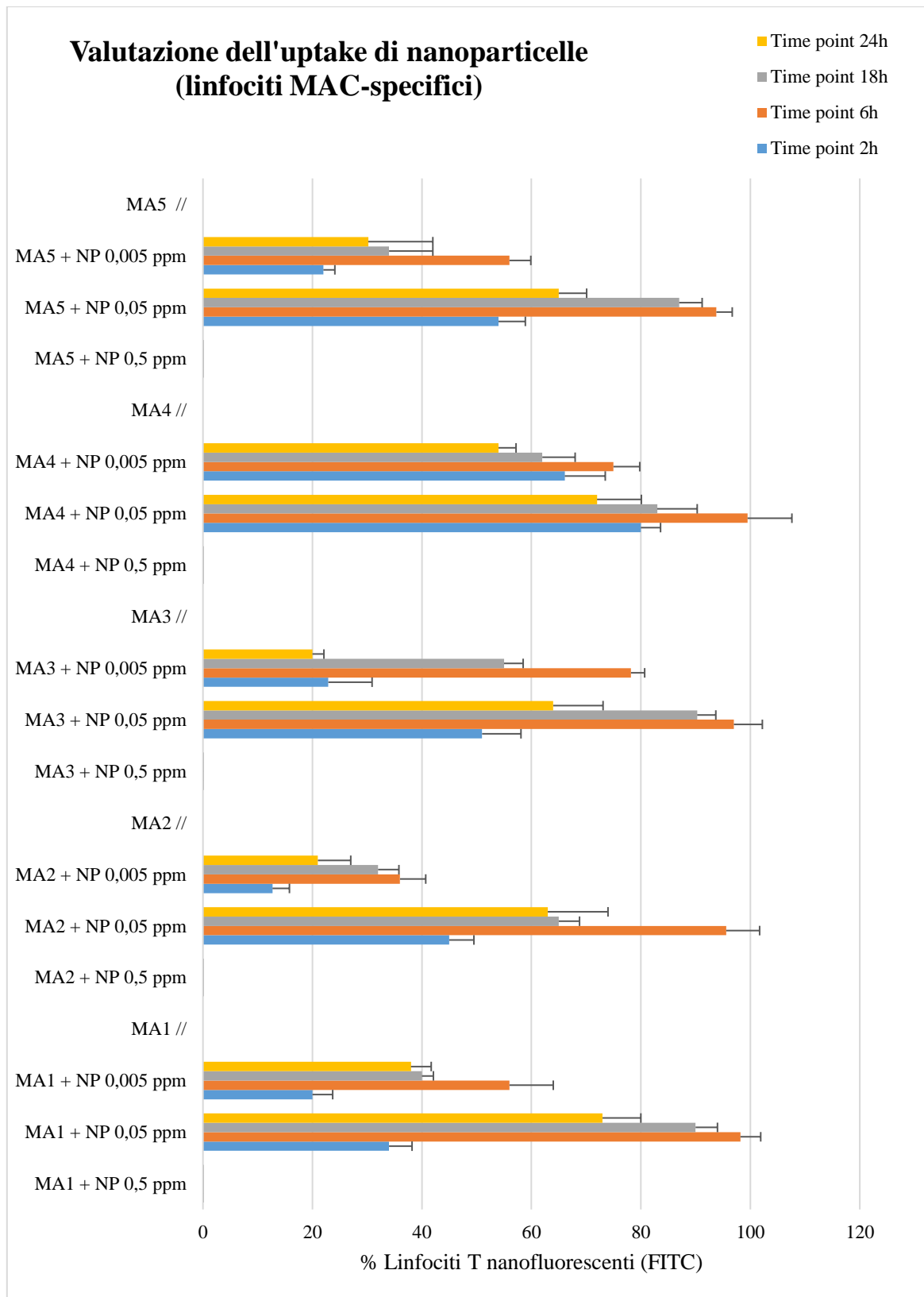
I risultati sono riassunti in Figura 14 e Figura 15.

La concentrazione di nanoparticelle a 0,5 ppm è probabilmente risultata eccessiva per tutte le colture effettuate poiché rendeva i risultati illeggibili al citofluorimetro per l'eccessivo sporco di fondo residuo. Alle altre due concentrazioni i linfociti T sembrano stati capaci di caricare al loro interno le nanoparticelle.

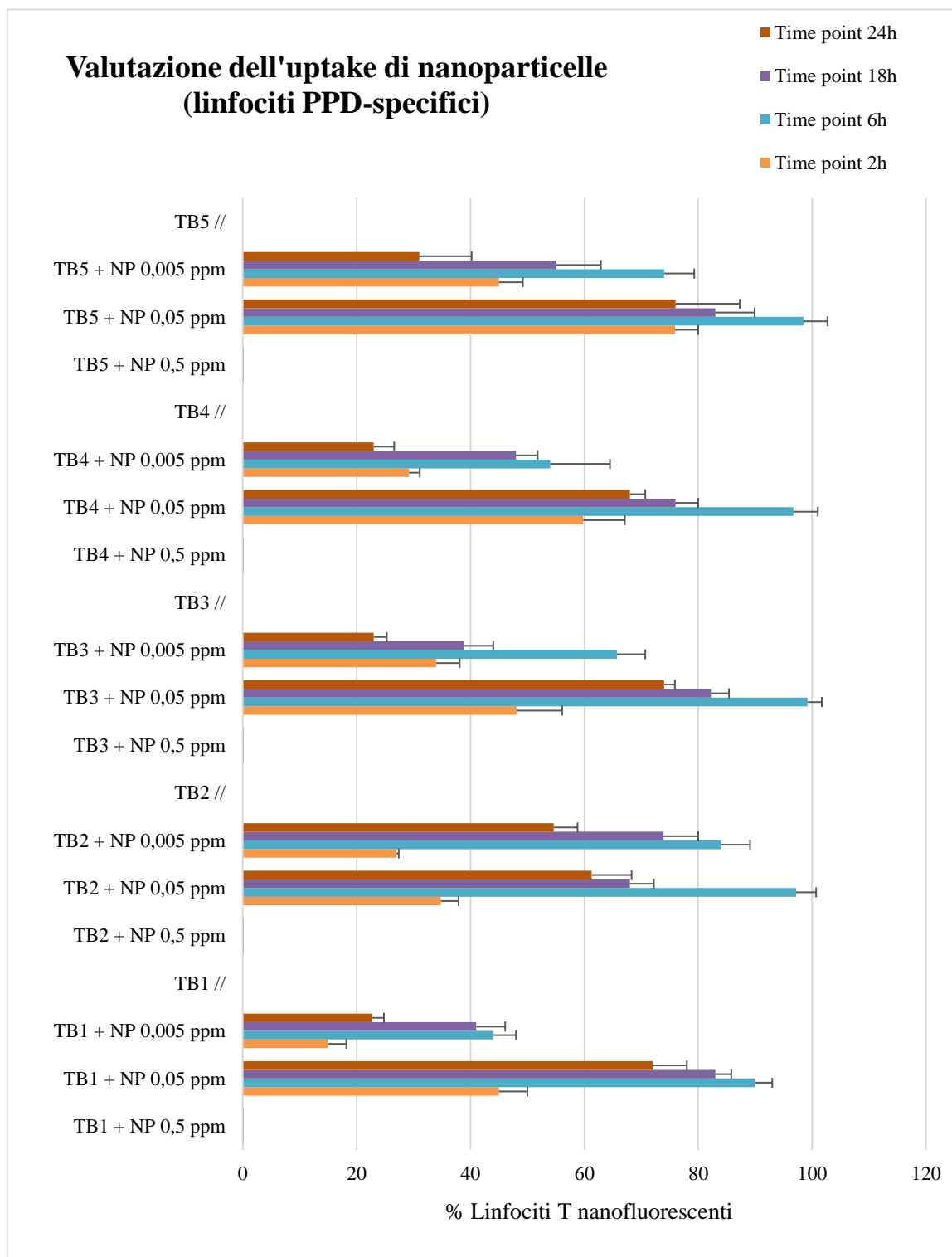
Per tutte le linee antigene-specifiche testate la concentrazione ottimale sembrerebbe essere quella a 0,05 ppm di magnetite, in particolare dopo 6h di incubazione, dove la quasi totalità delle cellule sembra assumere le NP. Anche alla concentrazione 0,005 ppm ad ogni modo si è avuta una certa incorporazione a tutti i time-point anche se non è risultata ottimale.

Da notare come al time point 18h prima e a quello 24h poi, la percentuale di cellule che risulta aver inglobato le nanoparticelle sembra decrescere. Questo sarà argomento di ulteriori indagini per capire se le cellule T estrudano effettivamente le NP oppure se ad esempio il fluorocromo si dissocia semplicemente dalla loro superficie.

Non ci sono state sostanziali differenze di uptake tra le cellule delle linee specifiche per gli antigeni di *Micobacterium Avium Complex* e quelle specifiche per PPD.



**Figura 14. Linfociti T MAC-specifici nanofluorescenti dopo incorporazione delle nanoparticelle magnetiche legate al fluorocromo FITC (Fluorescenza FITC sulla popolazione CD3+).**



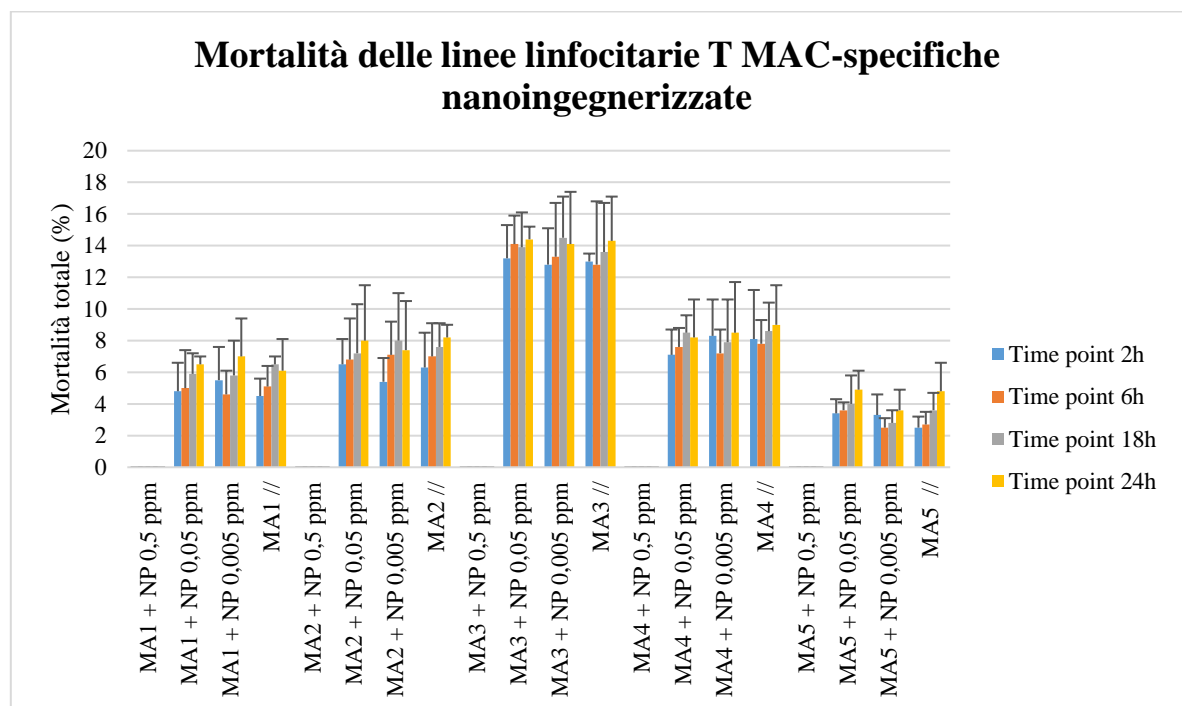
**Figura 15. Linfociti T PPD-specifici nanofluorescenti dopo incorporazione delle nanoparticelle magnetiche legate al fluorocromo FITC (Fluorescenza FITC sulla popolazione CD3+).**

#### 4.5 VITALITA' DELLE LINEE LINFOCITARIE ANTIGENE-SPECIFICHE NANOINGEGNERIZZATE

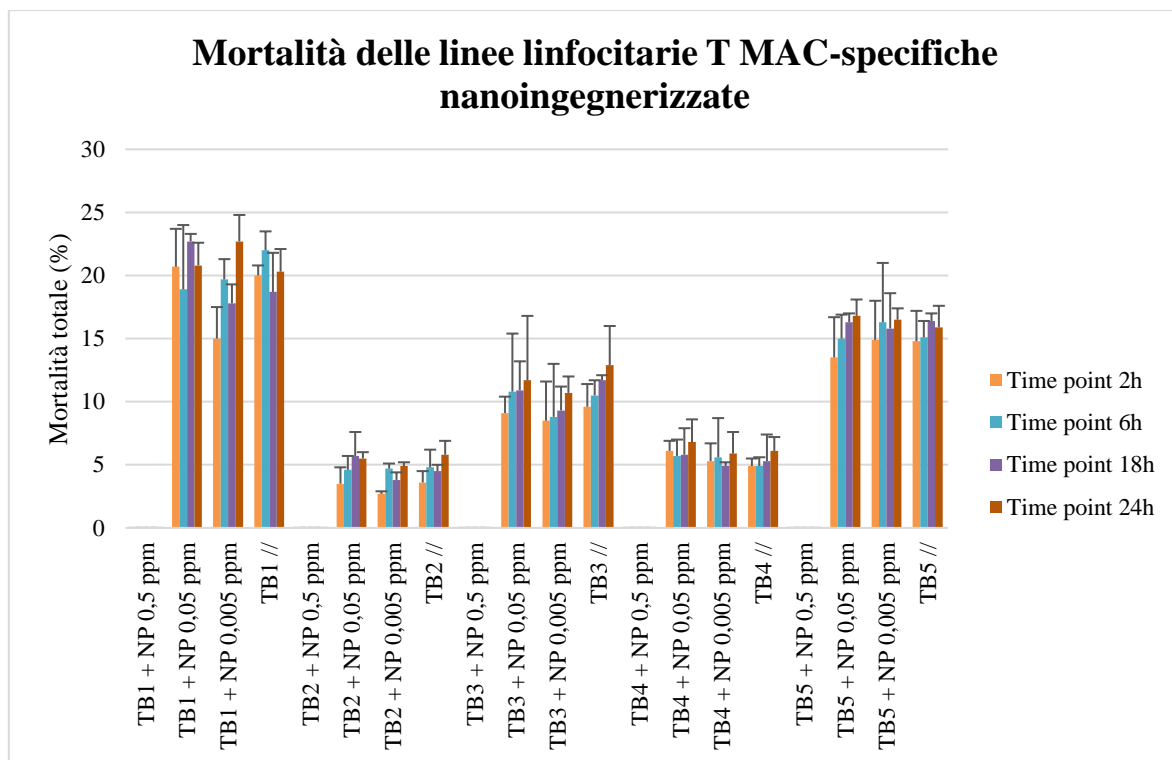
La vitalità delle linee linfocitarie MAC-specifiche e PPD-specifiche è stata valutata, ad ogni time point, mediante analisi citofluorimetrica utilizzando una marcatura PI e leggendo i risultati ad un citofluorimetro FACSCanto.

Anche in questo caso non è stato possibile leggere i risultati della concentrazione 0,5 ppm di magnetite per nessuna delle linee per il troppo residuo di fondo che interferiva per una corretta interpretazione dei dati.

La nanoingegnerizzazione delle linee linfocitarie T specifiche per *Micobacterium avium complex* o per PPD, non ha influito sulla mortalità cellulare in nessuno dei casi analizzati; la percentuale di cellule morte in ciascuna popolazione è rimasta pressochè invariata rispetto alle cellule incubate in terreno privo di NP (//) ad ogni time point analizzato, sia per la concentrazione 0,05 ppm che per quella 0,005 ppm. I risultati sono illustrati nelle figure 16 e 17.



**Figura 16. Mortalità cellulare (%) delle linee linfocitarie MAC-specifiche nanoingegnerizzate.**



**Figura 17. Mortalità cellulare (%) delle linee linfocitarie PPD-specifiche nanoingegnerizzate.**

## 5. DISCUSSIONE

La diagnosi di linfadeniti da NTM, insieme alla maggior parte delle patologie dovute all'infezione con i micobatteri non tubercolari, rimane una sfida per gli infettivologi. Studi precedenti indicano che la combinazione di un TST positivo e un test IGRA negativo potesse suggerire un'infezione da NTM ma è riportato che risultati negativi per il test TST sono, altresì, possibili per 1/3 delle infezioni [94,95]. Nel nostro studio sui pazienti pediatrici la percentuale riscontrata è più alta, circa il 60% dei test effettuati nei bambini infetti da NTM risulta essere negativo mentre il 6,6% risulta avere un indurimento tra 5 e 9 mm. Con l'obiettivo di incrementare la sensibilità dei test intradermici, alcuni autori suggeriscono l'uso di antigeni derivati da NTM, ma in letteratura si riscontra un'alta percentuale di falsi positivi (6-32%). Le difficoltà di diagnosi sono aumentate anche dalla possibilità di riscontrare un test IGRA positivo in pazienti con infezioni da alcune specie di NTM. Infatti, i test IGRA sono basati sulla risposta ESAT-6 e CFP-10, proteine sintetizzate anche in *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ziyadhense* e *M. szulgai* [60]. Nel presente studio i test IGRA risultano negativi in tutti i bambini, probabilmente perché nessun paziente era infettato dalle specie menzionate sopra. I risultati mostrano che il test ELISpot per IL-2 e IFN- $\gamma$  con lisati provenienti da *M. avium*, possono essere d'aiuto per la diagnosi d'infezione da NTM in bambini con linfadenopatie, mentre il test ELISpot basato su IL-17 ha dimostrato bassa prestazione. Lo studio pilota sulla popolazione adulta ha anch'esso valutato il ruolo di IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17 in soggetti con infezione NTM, sani e controlli di malattia allo scopo di identificare biomarcatori ematici da poter utilizzare a fine diagnostico mediante test ELISpot.

Avendo maggior disponibilità di sangue rispetto ai prelievi pediatrici abbiamo selezionato, oltre a *M. avium*, una gamma di lisati e antigeni da brodo di coltura delle specie più comuni di NTM (*M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. kansasii* e *M. bolletii*, lipomannano di *M. avium paratuberculosis* e Ala-DH di *M. ulcerans*) e testati antigeni di MTB (PPD, ESAT-6, CFP-10, Ala-DH e lipomannano di BCG) per analizzarne eventuale crossreattività.

Il presente studio è il primo che analizza la prestazione tra ELISpot basati su IL-2 e IFN- $\gamma$  nelle infezioni da NTM. In letteratura è reperibile solo uno studio su test ELISpot per IFN- $\gamma$  per la diagnosi delle infezioni NTM [52] che utilizza il test T. SPOT.TB modificato utilizzando una miscela antigenica con proteina derivata purificata (PPD) che stimola i PBMCs. La miscela PPD contiene molti antigeni micobatterici che cross-reagiscono con

BCG, MTB e molte specie NTM. Il T. SPOT.TB modificato ha rivelato il 100% di sensibilità e l'80% di specificità ma potrebbe non distinguere tra infezioni MTB o infezioni NTM o bambini BCG vaccinati, cosa che non accade con il nostro ELISpot per IFN- $\gamma$  che ha dimostrato avere una sensibilità di 81,3% e specificità di 71,4%.

I risultati preliminari del test ELISpot per IFN- $\gamma$  negli adulti evidenziano una differenza significativa nella produzione della citochina fra soggetti sani e infetti da NTM sia pre che post-terapia in risposta a tutti gli antigeni di NTM eccetto per *M. bolletii* e Ala-DH con un'accuratezza del 100% per *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi* e *M. abscessus*. I controlli di malattia, MTB infetti, invece, non reagiscono con significatività statistica rispetto al gruppo degli infetti NTM, se non a *M. xenopi* che si propone dunque come specie più promettente a fini diagnostici differenziali dei due tipi di infezioni micobatteriche.

I cinque pazienti NTM infetti selezionati hanno diagnosi effettuata su isolamento del batterio e mancano di indagine TST/IGRA; nello studio pilota risultano rispondere anch'essi agli antigeni ESAT-6 e CFP-10 presenti negli IGRA e alla PPD del TST confermando tali test non indicati per la diagnosi differenziale fra infezione NTM e MTB. Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio sia su bambini che su adulti hanno valutato la prestazione del test ELISpot IL-2 per la diagnosi delle infezioni da MTB e per discriminazione tra la tubercolosi attiva e latente [26,27]. La sensibilità dei lisati di *M. avium* per il test ELISpot basato su IL-2 nel distinguere i bambini infetti da chi non lo è, ha raggiunto l'87,5%, con una specificità dello 85,7%. Però, la specificità potrebbe essere stata influenzata da una possibile esposizione asintomatica a NTM nei gruppi di controllo.

Il nostro studio, inoltre, osserva che i trattamenti anti-micobatterici non influenzano le prestazioni dei test ELISpot IL-2 e IFN- $\gamma$  e i risultati non risultano utili per predire un ulteriore intervento.

Valutando l'efficienza del test ELISpot per IL-2 negli adulti, si ottiene un risultato interessante solo per *M. avium* se valutato prima dell'inizio della terapia sia rispetto al gruppo dei sani che dei malati di tubercolosi.

L'antigene Ala-DH di MTB, un nuovo tool identificato per la diagnostica differenziale fra tubercolosi attiva e quella latente [53], risulta inoltre stimolare la produzione di IL-2 nei pazienti con tubercolosi ma non in quelli NTM-infetti, risultando di ulteriore interesse per la diagnosi differenziale fra infezione MTB e NTM.

Un'interessante scoperta è che il numero degli spots rilevati con il test ELISpot IL-2 è molto alto nei bambini con linfadenopatie iniziate da prima dei 3 mesi; al contrario, il numero degli spots per ELISpot IFN- $\gamma$  risulta essere maggiore in chi ha più recente manifestazione di linfadenopatia. Questi risultati probabilmente riflettono l'aumentato numero di cellule T secernenti IL-2 e la riduzione di T produttori IFN- $\gamma$  in pazienti con recente comparsa di linfadenopatia, forse dovuto alla lenta replicazione batterica e basso carico antigenico. Questi dati sono simili a quelli osservati in bambini con infezioni MTB, infatti, la quantità di IL-2 secreta dalle cellule T in TB latente sembra essere più alto dei livelli trovati in pazienti con TB attiva [52,96].

In conclusione, il test ELISpot basato su IL-2 e IFN- $\gamma$  sembra essere utile nel distinguere tra bambini infetti NTM e non infetti. Considerando il presente, un test non invasivo per la diagnosi delle linfadenopatie da NTM non è disponibile e pertanto i test ELISpot IL-2 e IFN- $\gamma$  potrebbero essere d'aiuto come diagnosi precoce per indirizzare i bambini in un approccio terapeutico giusto. Tuttavia, il ruolo dei test ELISpot basati su IL-2 e IFN- $\gamma$  nel distinguere tra bambini infetti e non dovrebbe essere confermato da studi prospettici pediatrici più grandi oltre a procedere con l'arruolamento dei pazienti adulti dello studio pilota oggetto di questa tesi.

Infine, è stata osservata una bassa prestazione dei test ELISpot per IL-17 nel distinguere tra bambini infetti NTM e non infetti. Il ruolo di IL-17 nelle infezioni da micobatteri rimane ancora non chiaro. È stato recentemente riportato che IL-17 è coinvolta nella risposta immune precoce ai MAC. Persistenti alti livelli di IL-17 sono associati con infiammazione del tessuto danneggiato e risultati negativi [97,98].

Come nel bambino, anche nell'adulto il test ELISpot per IL-17 non ha dato risultati soddisfacenti se non mostrando una significativa differenza di produzione di IL-17 indotta solo in fase pre-terapia da *M. kansasii* rispetto ai controlli sani.

La resistenza agli antibiotici è oggi uno dei principali problemi di salute pubblica a livello mondiale ed il trattamento delle infezioni dovute sia ai micobatteri tubercolari che non tubercolari trova difficoltà proprio per questa ragione. Soluzioni alternative all'uso degli antibiotici per la cura delle malattie infettive possono essere apportate dall'utilizzo della nanomedicina [69, 81-89]. Nel laboratorio del prof. D'Elis da un decennio si lavora per trovare soluzioni alternative per la cura di varie patologie (neurologiche e tumorali) proprio con l'utilizzo della nanotecnologia, mettendo a punto sistemi di targeted-delivery formati da linfociti T antigene-specifici caricati con nanoparticelle ferromagnetiche (Trojan horses), che possono essere rilasciate nel sito bersaglio in maniera estremamente specifica. Con

l'applicazione di un campo magnetico alternato nel sito bersaglio si dovrebbe riuscire ad avere un innalzamento termico (ipertermia) che provoca la morte cellulare, nel nostro caso dei micobatteri o dei macrofagi da essi infettati. Oltre che per fini terapeutici questo sistema torna utile in contemporanea per fini diagnostici in quella branca della nanomedicina che prende il nome di teranostica [80, 99, 100]. Seguendo questa linea di ricerca, abbiamo pensato di creare un sistema analogo utilizzando linfociti T specifici per gli antigeni di *Mycobacterium Avium Complex* e PPD (antigeni di *Mycobacterium Tuberculosis*). Per questo scopo sono state indotte delle linee cellulari MAC-specifiche oppure PPD-specifiche dal sangue dei pazienti con infezione da *Mycobacterium Avium* e *Mycobacterium Intracellulare* oppure con tubercolosi attiva. Ciascuna linea antigene-specifica è stata nanoingegnerizzata con nanoparticelle di magnetite fluorescenti a varie concentrazioni (0,5-0,05-0,005 ppm) e per vari time points (2h-6h-18h-24h). La valutazione dell'uptake da parte dei linfociti T di ciascuna linea, effettuata analizzando la % di cellule nanofluorescenti al citofluorimetro, ha dato risultati molto promettenti, soprattutto per quanto riguarda la concentrazione 0,05 ppm con 6h di incubazione in cui la quasi totalità delle cellule T ha incorporato le nanoparticelle. Resta da definire se, ad intervalli di tempo superiori, le nanoparticelle vengano estruse dalle cellule, in quanto la percentuale di fluorescenza al loro interno tendeva generalmente a diminuire passate le 18h e le 24h. Anche l'analisi della vitalità delle cellule T nanoingegnerizzate ha dato risultati promettenti. La mortalità delle cellule T in presenza o assenza delle nanoparticelle, a ciascun time point e per ciascuna concentrazione (a parte la concentrazione 0,5 ppm che è risultata eccessiva per una corretta interpretazione dei risultati) è rimasta pressochè invariata. Resta da valutare se la presenza delle nanoparticelle all'interno dei linfociti T influisca sulla loro capacità funzionale (produzione di citochine), studio che è tutt'ora in corso.

Questi risultati, benchè fortemente preliminari e solo all'inizio di un lungo iter di esperimenti per la valutazione dell'efficacia e la sicurezza di questo tipo di trattamento, sono molto incoraggianti e ci spingono ad andare avanti con ulteriori prove allo scopo raggiungere il nostro obiettivo finale, che è quello di creare un'alternativa all'uso degli antibiotici in un'epoca in cui questi non sempre riescono a salvarci.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Van Ingen J. Mycobacteria. Infectious Diseases. 2017;2: 1645-1659.e2.
2. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. Clin Microbiol Infect. 2014 Mar;20(3):196-201.
3. Meehan CJ, Barco RA, Loh HWE, Cogneau S., Rigouts L. Reconstituting the genus *Mycobacterium*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021;71:004922.
4. Forbes BA. Mycobacterial Taxonomy. 2017;55(2): 380-383.
5. Percival S.L., Williams D.W. Mycobacterium. Microbiology of Waterborne Diseases. 2014;9:177-207.
6. Payeur JB. Mycobacterium. Encyclopedia of Food Microbiology. 2014;2:841-853.
7. Tortoli E, Piersimoni C et al “Micobatteriologia Clinica” CEA 2013.
8. Koh WJ, Kwon OJ., Lee KS. Nontuberculous mycobacterial pulmonary diseases in immunocompetent patients. Korean J Radiol. 2002;3:145-157.
9. Johansen MD, Herrmann JL, Kremer L. Non-tuberculous mycobacteria and the rise of *Mycobacterium abscessus*. Nat Rev Microbiol. 2020 Jul;18(7):392-407.
10. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, Allix C, Aristimuño L, Arora J, Baumanis V, Binder L, Cafrune P, Cataldi A, Cheong S, Diel R, Ellermeier C, Evans JT, Fauville-Dufaux M, Ferdinand S, Garcia de Viedma D, Garzelli C, Gazzola L, Gomes HM, Gutierrez MC, Hawkey PM, van Helden PD, Kadival GV, Kreiswirth BN, Kremer K, Kubin M, Kulkarni SP, Liens B, Lillebaek T, Ho ML, Martin C, Martin C, Mokrousov I, Narvskaja O, Ngeow YF, Naumann L, Niemann S, Parwati I, Rahim Z, Rasolofoa-Razanamparany V, Rasolonavalona T, Rossetti ML, Rüschi-Gerdes S, Sajduda A, Samper S, Shemyakin IG, Singh UB, Somoskovi A, Skuce RA, van Soolingen D, Streicher EM, Suffys PN, Tortoli E, Tracevska T, Vincent V, Victor TC, Warren RM, Yap SF, Zaman K, Portaels F, Rastogi N, Sola C. Mycobacterium

tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol. 2006 Mar 6;6:23.

11. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2020. ISBN: 9789240013131. Available on: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
12. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2021 –2019 data. Available on: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tuberculosis-surveillance-and-monitoring-europe-2021-2019-data>.
13. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2021. ISBN: 9789240037021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
14. Jeremiah C , Petersen E , Nantanda R , Mungai BN , Migliori GB , Amanullah F , Lungu P<sup>7</sup> , Ntoumi F , Kumarasamy N , Maeurer M , Zumla A .The WHO Global Tuberculosis 2021 Report - not so good news and turning the tide back to End TB. Int J Infect Dis. 2022;S1201-9712(22)00149-7.
15. World Health Organization. Guidelines on the Management of Latent Tuberculosis Infection. Geneva, 2015. Available from: <http://www.who.int/tb/publications/latent-tuberculosis-infection/en/>.
16. Milner DAJ, Pecora N, Solomon I, Soong TR. Diagnostic Pathology: Infectious Diseases. 2016. Elsevier. ISBN: 978-0-323-37677-8.
17. Hoppe LE, Kettle R, Eisenhut M, Abubakar I, on behalf of the Guideline Development Group. Tuberculosis—diagnosis, management, prevention, and control: summary of updated NICE guidance. BMJ. 2016;352:h6747 .
18. Documento di linee-guida per il controllo del morbo di Hansen in Italia. (GU Serie Generale n.176 del 29-07-1999 - Suppl. Ordinario n. 144)

19. Barbieri L, Strocchi E et al “Lezioni di patologia generale” II edizione digitale Rimini, campus Rimini 2011
20. Sharma SK, Upadhyay V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. *Indian J Med Res* 2020;152:185-226.
21. Falkinham III JO. Ecology of Nontuberculous Mycobacteria. *Microorganisms*. 2021;9:2262.
22. Katoch WM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res*. 2004;120(4):290-304.
23. Dowdell K, Haig SJ, Caverly LJ, Shen Y, LiPuma JJ, Raskin L. Nontuberculous mycobacteria in drinking water systems - the challenges of characterization and risk mitigation. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;57:127-136.
24. Busatto C, Vianna JS, da Silva LV Junior, Ramis IB, da Silva PEA. *Mycobacterium avium*: an overview. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019 ;114:127-134.
25. Shamaei M, Mirsaiedi M. Nontuberculous Mycobacteria, Macrophages, and Host Innate Immune Response. *Infect Immun*. 2021;89(8):e0081220.
26. Larsson LO, Bentzon MW, Berg Kelly K, Mellander L, Skoogh BE, Strannegård IL, Lind A. Palpable lymph nodes of the neck in Swedish schoolchildren. *Acta Paediatr*. 1994;83(10):1091-4.
27. Park YW. Evaluation of neck masses in children. *Am Fam Physician*. 1995;51(8):1904-12.
28. Ford TJ, Silcock RA, Holland SM. Overview of nontuberculous mycobacterial disease in children. *J Paediatr Child Health*. 2021;57(1):15-18.

29. Vu TT, Daniel SJ, Quach C. Nontuberculous mycobacteria in children: a changing pattern. *J Otolaryngol*. 2005;34 Suppl 1:S40-4.
30. Méndez Echevarría A, Baquero Artigao F, García Miguel MJ, Romero Gómez MP, Alves Ferreira F, Del Castillo Martín F. Adenitis por micobacterias no tuberculosas [Nontuberculous mycobacterial lymphadenitis]. *An Pediatr (Barc)*. 2007;66(3):254-9.
31. Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Groger RK, Brown EJ, Ratliff TL, Wilson R. Inhibition of adherence of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* to fibronectin on the respiratory mucosa. *Respir Med*. 2004;98(12):1203-6.
32. Simo R, Hartley C, Rapado F, Zarod AP, Sanyal D, Rothera MP. Microbiology and antibiotic treatment of head and neck abscesses in children. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1998;23(2):164-8.
33. Wei JL, Bond J, Sykes KJ, Selvarangan R, Jackson MA. Treatment outcomes for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children based on the type of surgical intervention. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;138(5):566-71.
34. Varley CD, Winthrop KL. Nontuberculous Mycobacteria: Diagnosis and Therapy. *Clin Chest Med*. 2022;43(1):89-98.
35. Ahmed I, Tiberi S, Farooqi J, Jabeen K, Yeboah-Manu D, Migliori GB, Hasan R. Non-tuberculous mycobacterial infections-A neglected and emerging problem. *Int J Infect Dis*. 2020;92S:S46-S50.
36. Kaczmarkowska A, Didkowska A, Kwiecień E, Stefańska I, Rzewuska M, Anusz K. The *Mycobacterium avium* complex - an underestimated threat to humans and animals. *Ann Agric Environ Med*. 2022;29(1):22-27.
37. Akram SM, Attia FN. *Mycobacterium Avium Intracellulare*. 2022 Feb 9. In: StatPearls [Internet].

38. Porvaznik I, Solovič I, Mokřý J. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2017;944:19-25.
39. Abe Y, Fukushima K, Hosono Y, Matsumoto Y, Motooka D, Ose N, Nakamura S, Kitada S, Kida H, Kumanogoh A. Host Immune Response and Novel Diagnostic Approach to NTM Infections. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4351.
40. Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Groger RK, Brown EJ, Ratliff TL, Wilson R. Inhibition of adherence of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* to fibronectin on the respiratory mucosa. *Respir Med.* 2004 Dec;98(12):1203-6.
41. Doffinger R, Patel S, Kumararatne DS. Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections. *Curr Opin Rheumatol.* 2005 Jul;17(4):440-6.
42. Faria S, Joao I, Jordao L. General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. *J Pathog.* 2015;2015:809014.
43. Abbas A K, Lichtman A H et al “Immunologia cellulare e molecolare” Edra VIII edizione 2017.
44. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb).* 2005;85(1-2):53-64.
45. Sexton P, Harrison AC. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. *Eur Respir J.* 2008;31(6):1322-33.
46. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-89.
47. Holland SM. Nontuberculous mycobacteria. *Am J Med Sci.* 2001;321(1):49-55.
48. Kellar KL, Gehrke J, Weis SE, Mahmutovic-Mayhew A, Davila B, Zajdowicz MJ, Scarborough R, LoBue PA, Lardizabal AA, Daley CL, Reves RR, Bernardo J, Campbell BH, Whitworth WC, Mazurek GH. Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *PLoS One.* 2011;6(11):e26545.

49. Malek TR, Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010; 33: 153–165.
50. Smith K A “Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications” *Science* Vol 40 2015
51. Vignoli M, Ciullini Mannurita S, Fioravanti A, Tumino M, Grassi A, Guariso G, Favre C, D'Elios MM, Gambineri E. CD25 deficiency: A new conformational mutation prevents the receptor expression on cell surface. *Clin Immunol.* 2019;201:15-19.
52. Chiappini E, Della Bella C, Bonsignori F, Sollai S, Amedei A, Galli L, Niccolai E, Del Prete G, Singh M, D'Elios MM, de Martino M. Potential role of *M. tuberculosis* specific IFN- $\gamma$  and IL-2 ELISPOT assays in discriminating children with active or latent tuberculosis. *PLoS One.* 2012;7(9): e46041.
53. Della Bella C, Spinicci M, Grassi A, Bartalesi F, Benagiano M, Truthmann K, Tapinassi S, Troilo A, D'Elios S, Alnwaisri H, Shuralev E, Singh M, Bartoloni A, D'Elios MM. Novel *M. tuberculosis* specific IL-2 ELISpot assay discriminates adult patients with active or latent tuberculosis. *PLoS One.* 2018;13(6): e0197825.
54. Søndergaard JN, Laursen JM, Rosholm LB, Brix S. *Mycobacterium tuberculosis* promotes Th17 expansion via regulation of human dendritic cells toward a high CD14 and low IL-12p70 phenotype that reprograms upon exogenous IFN- $\gamma$ . *Int Immunol.* 2014;26(12):705-16.
55. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, Dalod M, Soumelis V, Amigorena S. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 2013;38(2):336-48.
56. Mourik BC, Lubberts E, de Steenwinkel JEM, Ottenhoff THM, Leenen PJM. Interactions between Type 1 Interferons and the Th17 Response in Tuberculosis: Lessons Learned from Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2017;8:294.

57. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells..*Nat Rev Immunol.* 2017 Sep;17(9):535-544.
58. Jung BG, Samten B, Dean K, Wallace RJ Jr, Brown-Elliott BA, Tucker T, Idell S, Philley JV, Vankayalapati R. Early IL-17A production helps establish *Mycobacterium* intracellular infection in mice. *PLoS Pathog.* 2022;18(4):e1010454.
59. Claeys TA, Rosas Mejia O, Marshall S, Jarzembowski JA, Hayes D Jr, Hull NM, Liyanage NPM, Chun RH, Sulman CG, Huppler AR, Robinson RT. Attenuation of Helper T Cell Capacity for TH1 and TH17 Differentiation in Children With Nontuberculous Mycobacterial Infection. *J Infect Dis.* 2019;220(11):1843-1847.
60. Hermansen TS, Thomsen VØ, Lillebaek T, Ravn P. Non-tuberculous mycobacteria and the performance of interferon gamma release assays in Denmark. *PLoS One.* 2014;9(4):e93986.
61. Caruso G, Passàli FM, Salerni L, Molinaro G, Messina M. Head and neck mycobacterial infections in pediatric patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009;73 Suppl 1:S38-41.
62. Pennington KM, Vu A, Challener D, Rivera CG, Shweta FNU, Zeuli JD, Temesgen Z. Approach to the diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial disease. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis.* 2021;24:100244.
63. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ Jr, Winthrop K; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(4):367-416.
64. Aksamit TR. *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in patients with pre-existing lung disease. *Clin Chest Med.* 2002 Sep;23(3):643-53.
65. Swenson C, Zerbe CS, Fennelly K. Host Variability in NTM Disease: Implications for Research Needs. *Front Microbiol.* 2018;9:2901.

66. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis*. 2006;42(12):1756-63.
67. Kotlarz N, Raskin L, Zimbric M, Errickson J, LiPuma JJ, Caverly LJ. Retrospective Analysis of Nontuberculous Mycobacterial Infection and Monochloramine Disinfection of Municipal Drinking Water in Michigan. *mSphere*. 2019;4(4):e00160-19.
68. Kwon YS, Koh WJ, Daley CL. Treatment of *Mycobacterium avium* Complex Pulmonary Disease. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2019 Jan;82(1):15-26.
69. Saxena S, Spaink HP, Forn-Cuní G. Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):96.
70. Millar BC, Moore JE. Antimycobacterial strategies to evade antimicrobial resistance in the nontuberculous mycobacteria. *Int J Mycobacteriol*. 2019;8(1):7-21.
71. Tarashi S, Siadat SD, Fateh A. Nontuberculous Mycobacterial Resistance to Antibiotics and Disinfectants: Challenges Still Ahead. *Biomed Res Int*. 2022;2022:8168750.
72. Crilly NP, Ayeh SK, Karakousis PC. The New Frontier of Host-Directed Therapies for *Mycobacterium avium* Complex. *Front Immunol*. 2021;11:623119.
73. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*. 2019;25(1):112.
74. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. *Nanoscience and nanotechnologies*. 2004;1-127.
75. Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. Nanotechnology: History and future Human and Experimental Toxicology 2015, Vol. 34(12) 1318–1321.
76. Applications of nanotechnology. Available on: [www.nano.gov/about-nanotechnology/applications-nanotechnology](http://www.nano.gov/about-nanotechnology/applications-nanotechnology)

77. Tinkle S, McNeil SE, Mühlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz YC, Tamarkin L, Desai N. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1313:35-56.
78. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem.* 2018;6:360.
79. Ventola CL. The nanomedicine revolution: part 2: current and future clinical applications. *P T.* 2012;37(10):582-91.
80. D'Elia MM, Aldinucci A, Amoriello R, Benagiano M, Bonechi E, Maggi P, Flori A, Ravagli C, Saer D, Cappiello L, Conti L, Valtancoli B, Bencini A, Menichetti L, Baldi G, Ballerini C. Myelin-specific T cells carry and release magnetite PGLA-PEG COOH nanoparticles in the mouse central nervous system. *RSC Adv.* 2018;8(2):904-913.
81. Eleraky NE, Allam A, Hassan SB, Omar MM. Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations. *Pharmaceutics.* 2020;12(2):142.
82. Wang Z, Liu X, Duan Y, Huang Y. Infection microenvironment-related antibacterial nanotherapeutic strategies. *Biomaterials.* 2022;280:121249.
83. Rodrigues GR, López-Abarategui C, de la Serna Gómez I, Dias SC, Otero-González AJ, Franco OL. Antimicrobial magnetic nanoparticles based-therapies for controlling infectious diseases. *Int J Pharm.* 2019;555:356-367.
84. Yuan P, Ding X, Yang YY, Xu QH. Metal Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Bacterial Infection. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(13):e1701392.
85. Cheeseman S, Christofferson AJ, Kariuki R, Cozzolino D, Daeneke T, Crawford RJ, Truong VK, Chapman J, Elbourne A. Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications. *Adv Sci (Weinh).* 2020;7(10):1902913.

86. Velusamy P, Su CH, Kannan K, Kumar GV, Anbu P, Gopinath SCB. Surface engineered iron oxide nanoparticles as efficient materials for antibiofilm application. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;69(2):714-725.
87. Yeh YC, Huang TH, Yang SC, Chen CC, Fang JY. Nano-Based Drug Delivery or Targeting to Eradicate Bacteria for Infection Mitigation: A Review of Recent Advances. *Front Chem*. 2020;8:286.
88. Jampilek J, Kralova K. Advances in Nanostructures for Antimicrobial Therapy. *Materials (Basel)*. 2022;15(7):2388.
89. Basavegowda N, Baek KH. Multimetallic Nanoparticles as Alternative Antimicrobial Agents: Challenges and Perspectives. *Molecules*. 2021;26(4):912.
90. Juncker RB, Lazazzera BA, Billi F. The use of functionalized nanoparticles to treat *Staphylococcus aureus*-based surgical-site infections: a systematic review. *J Appl Microbiol*. 2021;131(6):2659-2668.
91. Allafchian A, Hosseini SS. Antibacterial magnetic nanoparticles for therapeutics: a review. *IET Nanobiotechnol*. 2019 Oct;13(8):786-799
92. [www.registroirene.it](http://www.registroirene.it)
93. Swets JA, Getty DJ, Pickett RM, D'Orsi CJ, Seltzer SE, McNeil BJ. Enhancing and evaluating diagnostic accuracy. *Med Decis Making*. 1991;11(1):9-18.
94. Lindeboom JA, Kuijper EJ, Prins JM, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R. Tuberculin skin testing is useful in the screening for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children. *Clin Infect Dis*. 2006;43(12):1547-51.
95. Staufner C, Sommerburg O, Holland-Cunz S. Algorithm for early diagnosis in nontuberculous mycobacterial lymphadenitis. *Acta Paediatr*. 2012;101(8):e382-5.
96. Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, Sauzullo I, Lastilla M, Mengoni F, Vanini V, Girardi E, Goletti D, D' Amelio R, Nisini R. Detection of interleukin-2 in

addition to interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(8):1282-4.

97. Vázquez N, Rekka S, Gliozzi M, Feng CG, Amarnath S, Orenstein JM, Wahl SM. Modulation of innate host factors by Mycobacterium avium complex in human macrophages includes interleukin 17. *J Infect Dis.* 2012;206(8):1206-17.
98. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine.* 2008;43(3):402-7.
99. Ratto F, Centi S, Avigo C, Borri C, Tatini F, Cavigli L, Kusmic C, Lelli B, Lai S, Benagiano M, D'Elios MM, Colagrande S, Faita F, Menichetti L, Pini R. A Robust Design for Cellular Vehicles of Gold Nanorods for Multimodal Imaging. *Adv. Funct. Mater.* 2016;39:7178.
100. Carnasciali A, Amoriello R, Bonechi E, Mazzoni A, Ravagli C, Doumet S, Cappiello L, D'Elis MM, Baldi G, Ballerini C. T Cell Delivery of Nanoparticles-Bound Anti-CD20 Monoclonal Antibody: Successful B Cell Depletion in the Spinal Cord during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2021 Jun;16(2):376-389.