

**Dottorato di Ricerca in Scienze Cliniche**  
**Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica**  
**XXXIV Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Lorenzo Cosmi**

**Dottorando:** Dott.ssa Alessia Grassi

**Tutore:** Prof. Mario Milco D'Elis

**Titolo Progetto di Ricerca**

Interazioni patogeno-ospite e nanomedicina in pazienti italiani e immigrati

**Sintesi dell'elaborato di tesi**

**Introduzione**

Le infezioni da micobatteri non tubercolari (NTM) rappresentano una causa conosciuta di malattia per l'essere umano. Fra le specie di NTM maggiormente associate a patologia nell'uomo figurano *M. abscessus* complex, il *M. kansasii* e *M. avium* complex (MAC), *M. xenopi*. MAC è l'agente causale di più del 75% dei casi di linfadeniti cervicali associata a NTM nei bambini, mentre negli adulti si stima che le infezioni da NTM siano per l'85% a carico dei polmoni. La diagnosi, sia nei bambini che negli adulti, è spesso tardiva e ha scarsa sensibilità per la mancanza di test specifici. Studi precedenti riportano un ruolo importante delle citochine IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17 nella protezione contro i micobatteri. Il trattamento delle infezioni da NTM è complesso e non sempre ben-tollerato e una diagnosi precoce è fondamentale. In più per queste infezioni si fa sempre più preoccupante il problema dell'antibiotico-resistenza e la nanotecnologia può rappresentare una valida alternativa per il trattamento di queste patologie.

**Scopo**

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 ELISpot. Lo studio è stato condotto sia su una popolazione pediatrica che su una popolazione adulta di soggetti con micobatteriosi, testandovi la produzione da parte dei linfociti T delle tre citochine in esame, in risposta a lisati delle specie più comuni di NTM. Nell'ultima parte dello studio una parte delle PBMC, provenienti dai soggetti adulti, è stata utilizzata per creare linee T antigene-specifiche le quali sono state successivamente nanoingegnerizzate con nanoparticelle (NP) di magnetite fluorescenti al fine di creare un sistema di delivery specifico.

**Materiali e Metodi**

Con una parte delle PBMCs isolate dal sangue periferico sia dei pazienti pediatrici che adulti, è stato condotto un test ELISpot per determinare la produzione di IL-2, IL-17 e IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T stimolati con lisati di solo *Mycobacterium avium complex* per i soggetti pediatrici, *Mycobacterium avium complex*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. abscessus* e *M. bolletii* per gli adulti. Con la parte restante di PBMCs isolate dai pazienti adulti sono state indotte linee MAC-specifiche oppure PPD-specifiche che sono state in seguito nanoingegnerizzate con NP magnetiche fluorescenti a varie concentrazioni e per diversi time-points. Su queste linee è stato valutato l'uptake di NP e la vitalità.

## **Risultati e Discussione**

I risultati ottenuti 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. In particolare risulta interessante l'alto numero di spots del test ELISpot IL-2 nei pazienti con linfadenopatie iniziate prima di 3 mesi, viceversa il numero degli spots per test ELISpot IFN- $\gamma$  è maggiore in chi ha più recente manifestazione di linfadenite. Lo studio pilota con soggetti adulti, mostra dei risultati preliminari del test ELISpot per IFN- $\gamma$  con evidenti differenze di produzione della citochina tra soggetti sani e soggetti infetti NTM sia pre- che post-terapia. L'efficienza del test ELISpot per IL-2 è rilevante solo per antigeni provenienti da *M. avium* tra pazienti pre-terapia e sani e controlli TB infetti. Anche in questo caso il test ELISpot per IL-17 non dimostra risultati soddisfacenti. In conclusione i test ELISpot per IL-2 e IFN- $\gamma$  potrebbero costituire importanti tool diagnostici non invasivi per la diagnosi di infezione da NTM. Le linee cellulari T MAC-specifiche e PPD-specifiche nanoingegnerizzate hanno dato risultati promettenti come possibile strumento terapeutico da usare in caso di antibiotico-resistenza sia per le infezioni da MAC che da tubercolosi. Tutte le linee analizzate hanno mostrato un uptake ottimale alla concentrazione 0,05 ppm e un tempo di incubazione di 6h. Inoltre la nanoingegnerizzazione non influenza la vitalità cellulare, incoraggiandoci ad andare avanti per raggiungere l'obiettivo di creare un sistema di nanodelivery specifico utile per fini teranostici (ipertermia e risonanza magnetica).