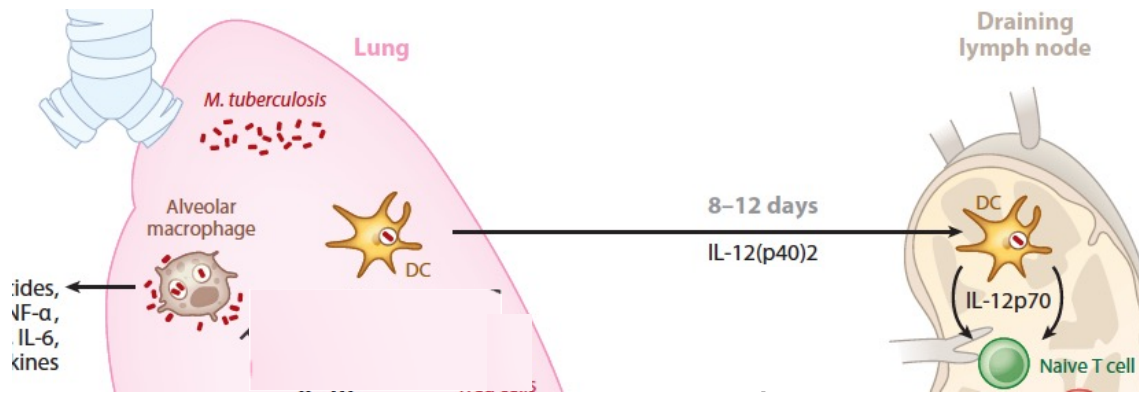
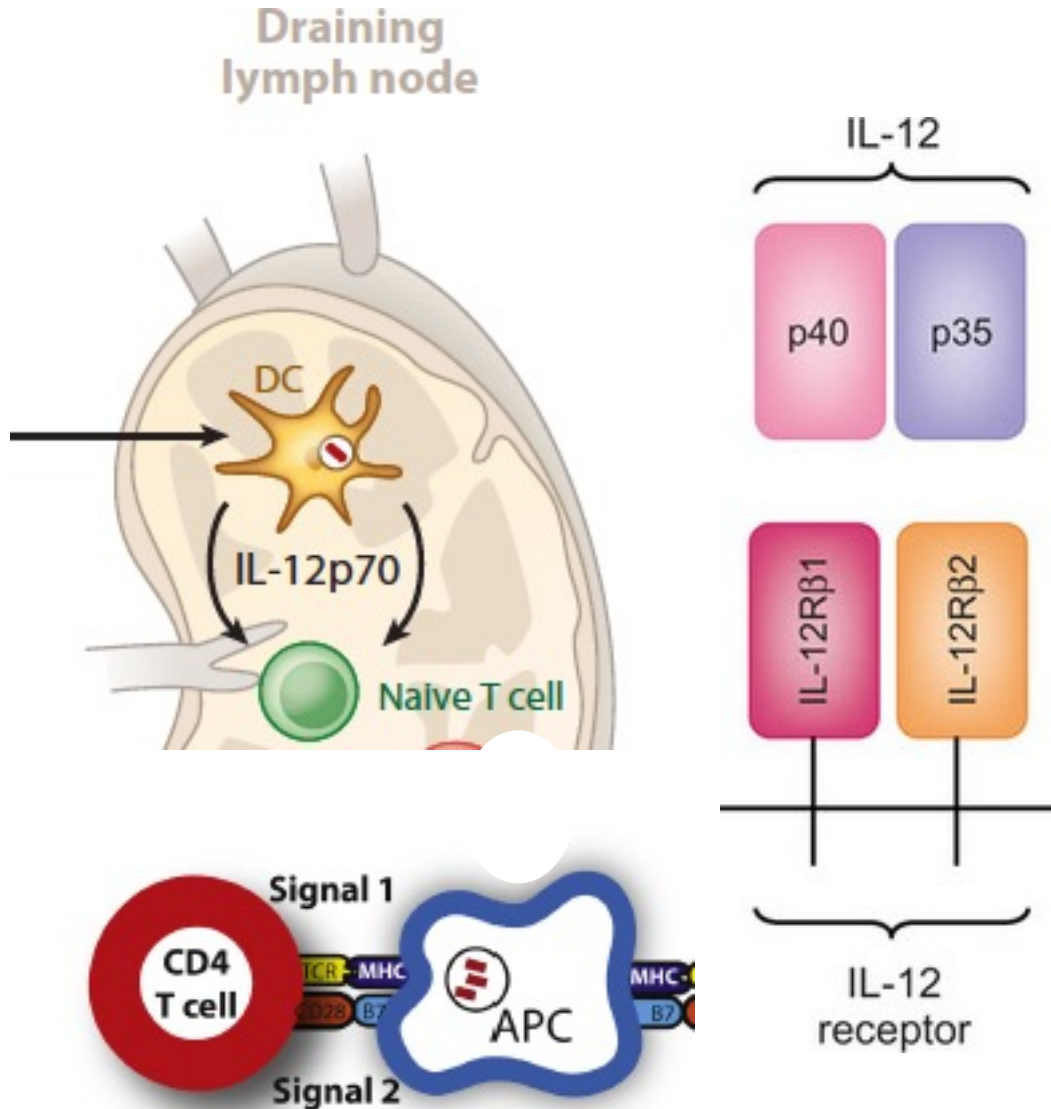


L'attivazione della risposta T Mtb specifica avviene nei linfonodi da parte delle cellule dendritiche



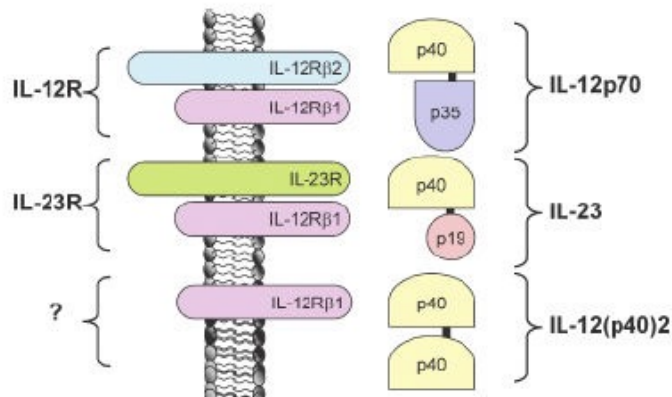
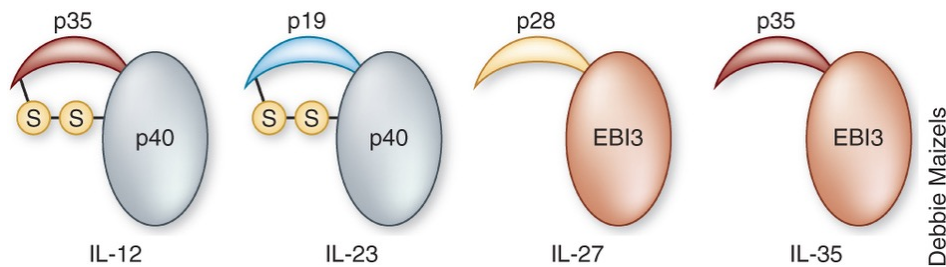
L'attivazione della risposta immune adattativa verso *M. tuberculosis* avviene nei linfonodi. Esperimenti effettuati somministrando via aerosol *M. tuberculosis* esprime la GFP ai topi hanno dimostrato che le cellule dendritiche nei linfonodi sono responsabili della attivazione dei linfociti T.

L'induzione dei linfociti Th1 *M. tuberculosis* specifici necessita dell'IL-12



I topi IL-12p35 o IL-12p40 KO mostrano un aumento della crescita dei batteri rispetto ai topi normali quando infettati con *M. tuberculosis* o il bacillo di Calmette e Guérin (BCG). I topi KO per l'IL-12p40 o p35 non sviluppano linfociti T in grado di produrre IFN- γ . Mutazioni nella catena IL-12R β 1 o della subunità p40 dell'IL-12 causano la Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD) caratterizzata da una maggiore suscettibilità all'infezione da parte di micobatteri.

Ruolo delle citochine appartenenti alla famiglia dell'IL-12 nell'induzione e nel mantenimento della risposta T contro *M. tuberculosis*



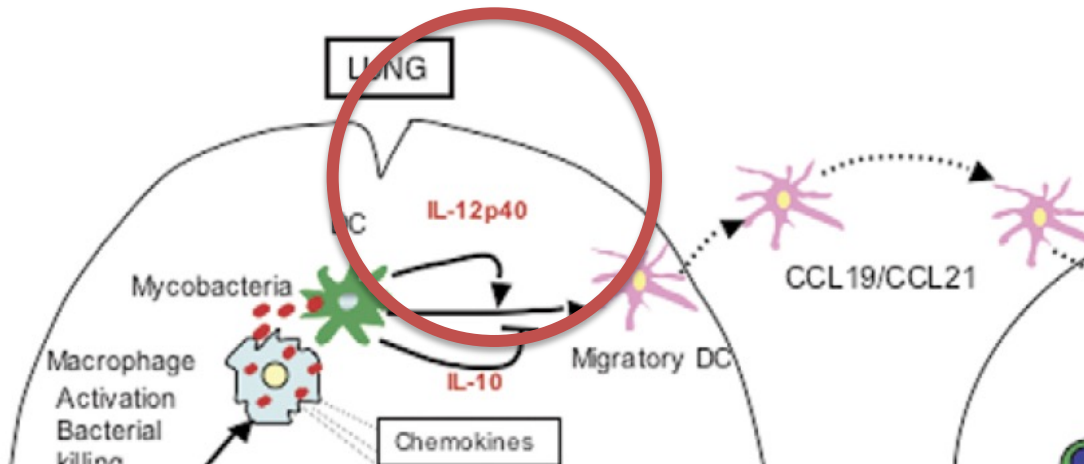
Le citochine appartenenti alla famiglia dell'IL-12 sono composte da due subunità la cui espressione è regolata indipendentemente. L'IL-12 è costituita dall'eterodimero 35p e 40p, l'IL-23 da p19 e p40, l'IL-27 da p28 e Epstein Barr virus induced gene 3 e p28, l'IL-35 da p35 e EBI3. Esistono inoltre monomeri o dimeri di p40 IL-12p40. Molti tipi cellulari sono in grado di produrre la subunità p35, solo le cellule dendritiche e i macrofagi producono la subunità p40.

Effetto dell'assenza dei diversi dimeri di IL-12p40 sul contenimento dell'infezione da *M. tuberculosis*

Table 1
Bacterial load in IL-12 knock out mice.

Strain	Present	Absent	Bacterial load (compared to WT)	
IL-12p40 ^{-/-}	–	IL-12(p40) ₂ IL-12p70 IL-23	↑↑	Lungs, spleen, liver, DLN – 4 weeks post aerosol <i>Mtb</i> ⁴⁷ Lungs, spleen, liver – 3 and 5 weeks post i.v. <i>Mtb</i> ⁴⁵ Lungs, spleen – 4 weeks post aerosol <i>Mtb</i> ³⁵
IL-12p35 ^{-/-}	IL-12(p40) ₂ IL-23	IL-12p70	↑	Lungs, spleen, liver, DLN – 4 weeks post aerosol <i>Mtb</i> ⁴⁷ Lungs, spleen, liver – 8 and 17 weeks post i.v. BCG ⁴⁶
IL-12p19 ^{-/-}	IL-12(p40) ₂ IL-12p70	IL-23	•	Lungs, spleen, liver, DLN – 4 weeks post aerosol <i>Mtb</i> ⁴⁷

Ruolo delle IL-12p40 nell'induzione della risposta T verso *M. tuberculosis*

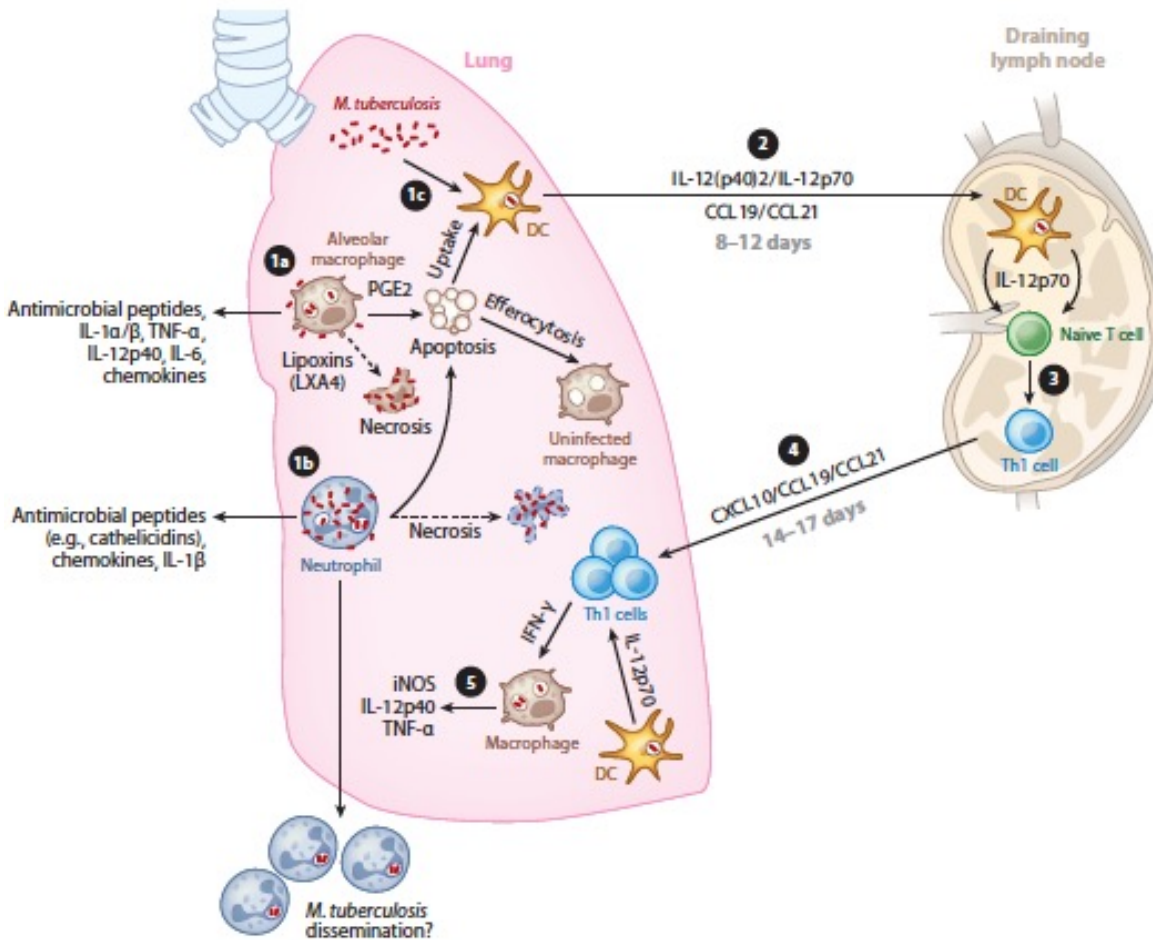


I topi KO per la catena p40 dell' IL-12 sono più suscettibili alla infezione da *M.tuberculosis* rispetto ai topi p35 KO.

Nei topi che mancano dell' IL-12p40 non si accumulano linfociti T attivati nel polmone. La migrazione delle DC, mediata dalle chemochine associate al reclutamento nei linfonodi, richiede la presenza di IL-12p40. L' esposizione delle DC al Micobatterio determina la secrezione di IL-12p40 che agisce in modo autocrino rendendo le DC responsive alle chemochine. L' omodimero IL-12p40 è secreto dalle DC in risposta alla stimolazione del TLR9 e del TLR2. Il DNA genomico di *M. tuberculosis* è un potente agonista del TLR9.

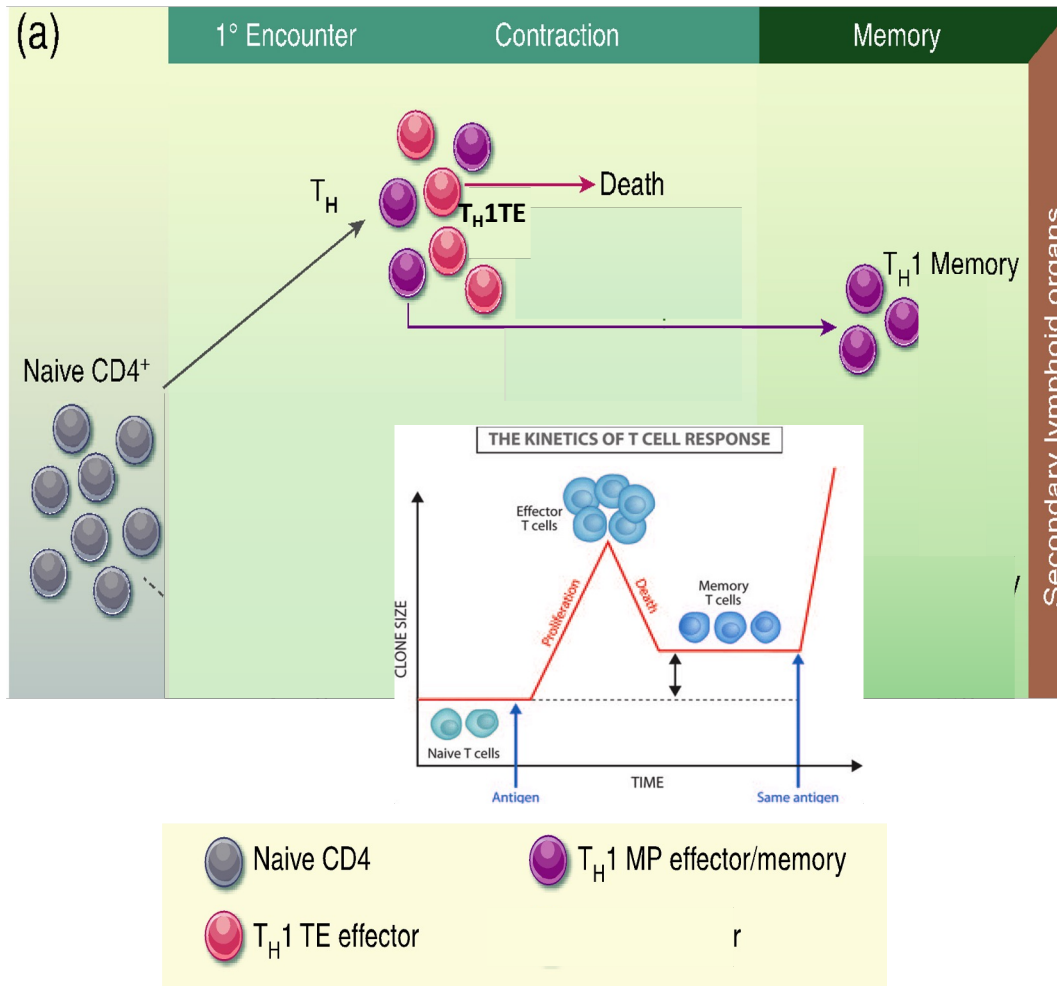
..

Migrazione dei linfociti Th1 nel polmone



I linfociti T naive in presenza di IL-12 differenziano in linfociti Th1. I linfociti Th1 specifici per il *M. tuberculosis* lasciano gli organi linfoidi e tornano nel polmone richiamati da chemochine specifiche. In seguito al contatto con i macrofagi i linfociti T produrranno IFN- γ e attiveranno i macrofagi.

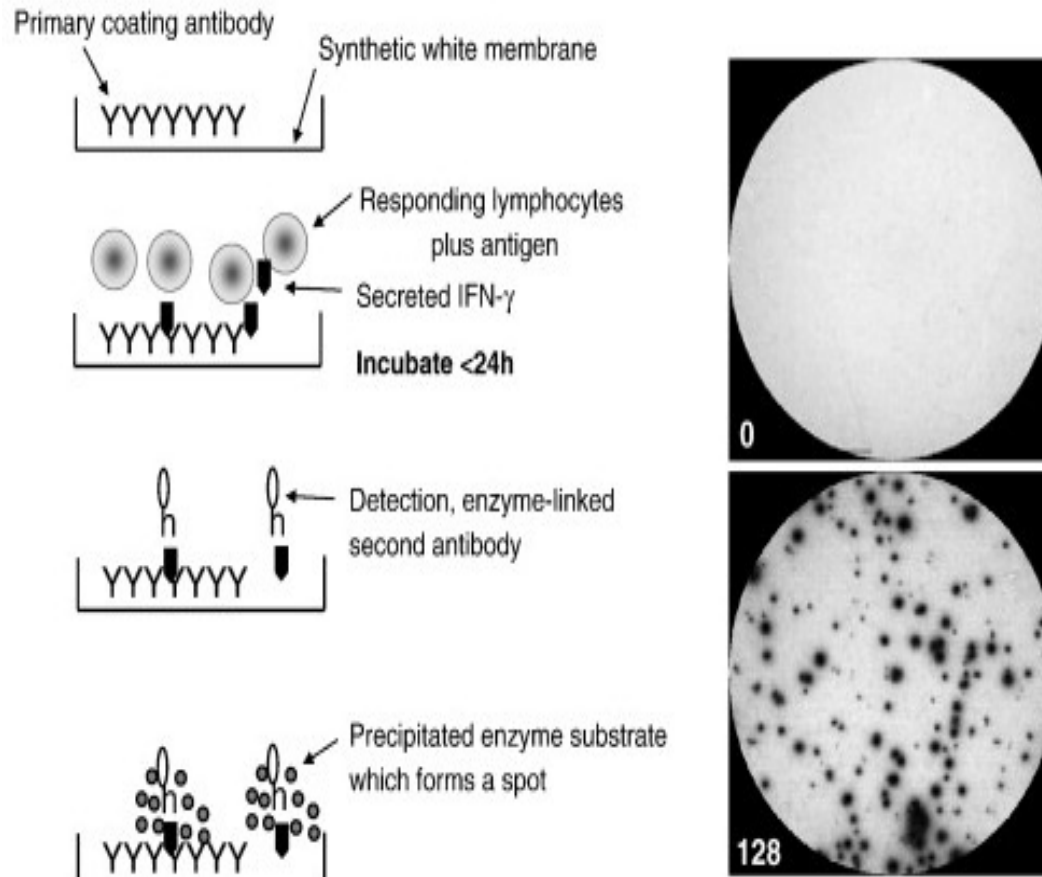
Generazione dei linfociti T effettori e della memoria



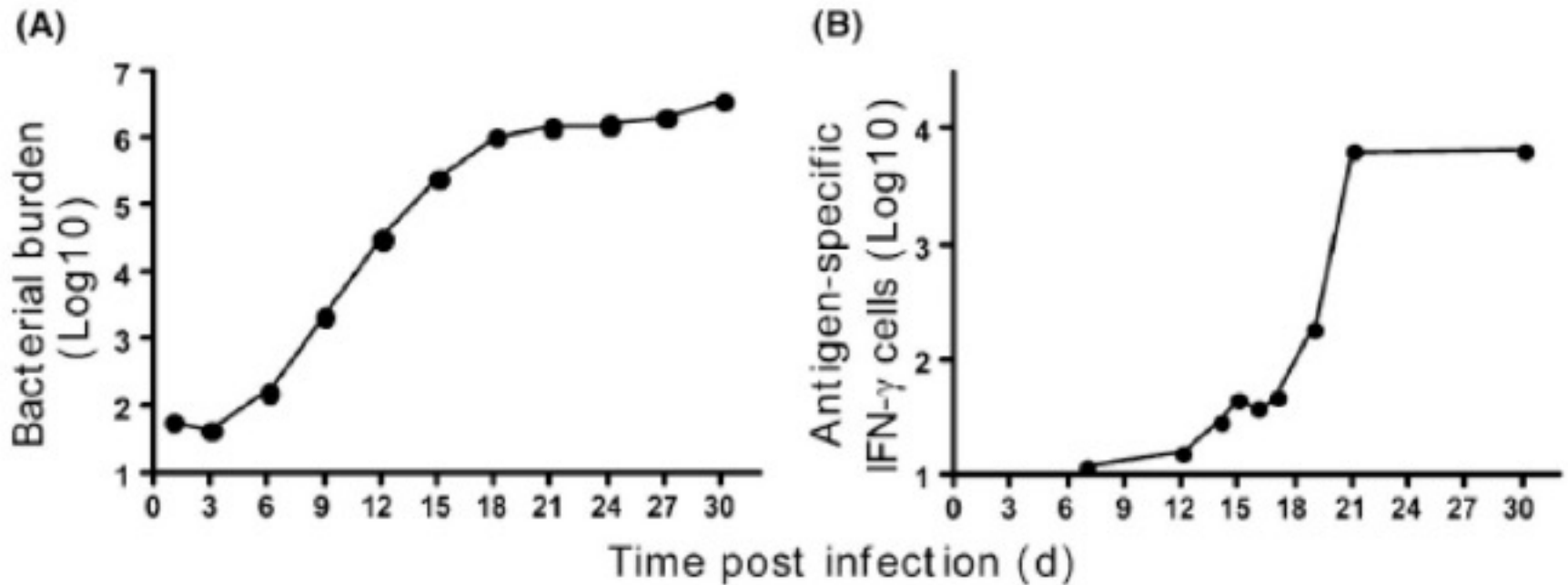
L'interazione con le cellule dendritiche presentanti l'antigene induce una elevata proliferazione dei linfociti T CD4 e il loro differenziamento in linfociti T effettori (TE) e linfociti T della memoria. I linfociti TE migrano nel sito dell'infezione e dopo aver eliminato il patogeno vanno incontro a morte mentre persistono i linfociti T della memoria. I linfociti T della memoria sono cellule non proliferanti che possono essere suddivise in sottopopolazioni in base all'espressione di marcatori di membrana, localizzazione tissutale e caratteristiche funzionali.

Il saggio Elispot permette di quantificare i linfociti T specifici per l'antigene producenti IFN- γ

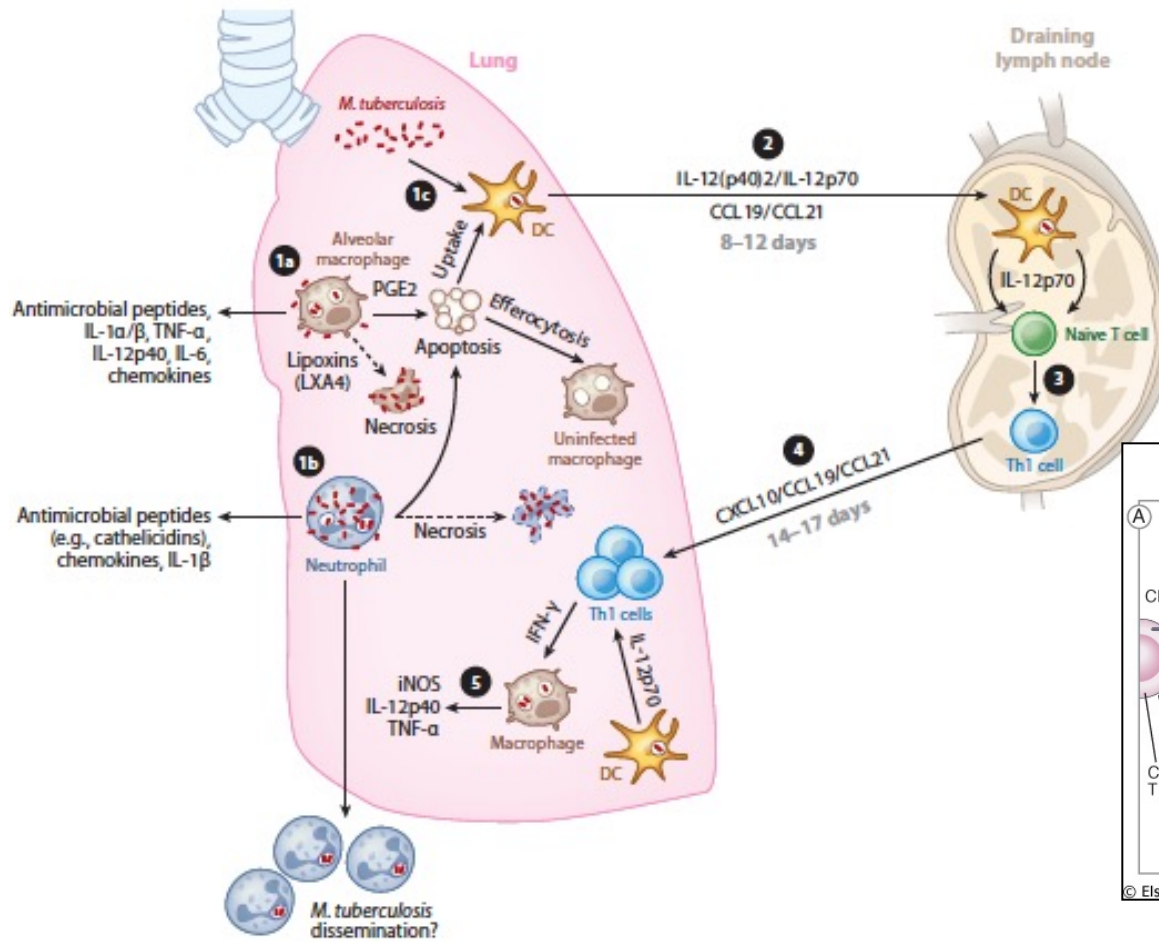
ELISPOT Assay



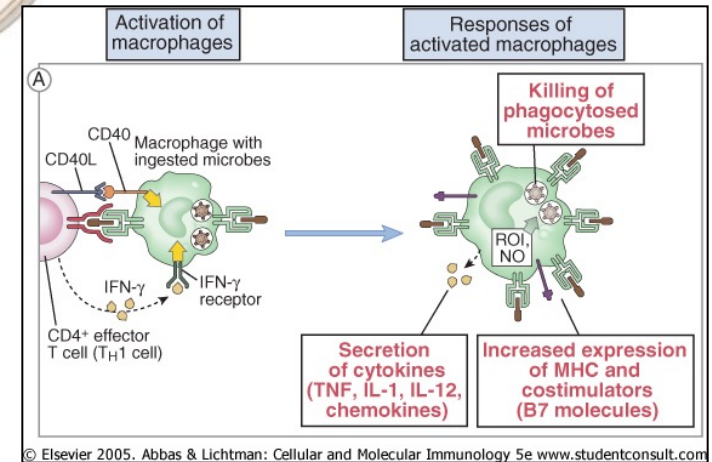
La presenza di linfociti T specifici per *M. tuberculosis* nel polmone si associa ad un arresto della replicazione batterica



L'attivazione e il richiamo nel polmone dei linfociti T CD4+ produttori IFN- γ sono necessari per il controllo dell'infezione da *M. tuberculosis*



L'IFN- γ , prodotto dai linfociti Th1 micobatterio specifici, attiva i macrofagi potenziandone l'attività antimicrobica.



Funzioni effettrici dei linfociti Th1 specifici per *M. tuberculosis*

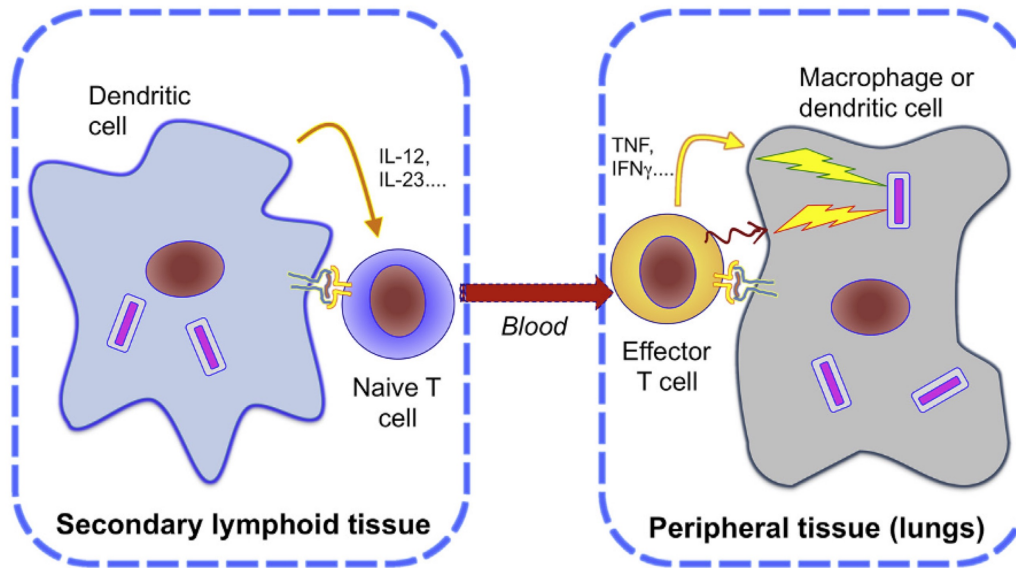
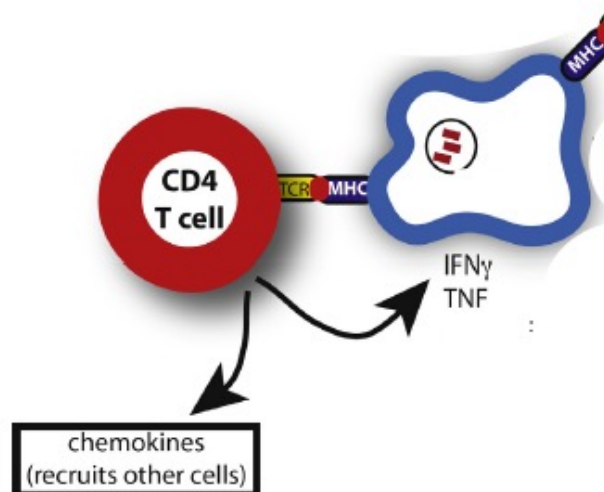


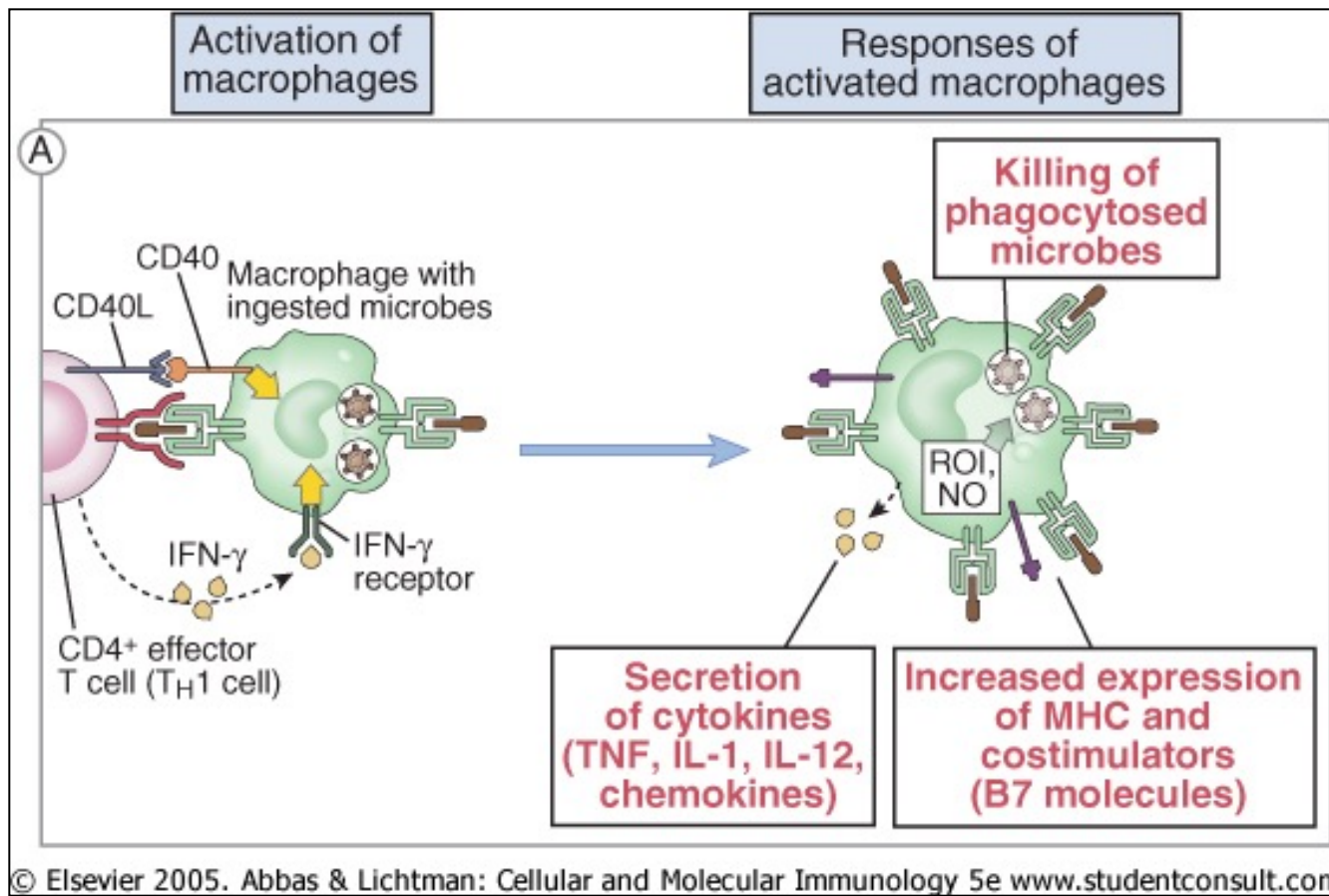
Figure 1. T Cells Must Be Activated in Distinct Compartments for Protection

Naive T cells are primed by their cognate antigens in secondary lymphoid tissues. Priming initiates the clonal expansion of T cells and is influenced by cytokines produced by dendritic cells, leading to their differentiation into effector or memory T cell subsets, and egress from the lymph node via the blood. To accomplish effector functions, T cells must traffic to the site of infection and be activated by recognizing their cognate epitope presented by infected cells, to secrete cytokines (curved solid arrow in figure) and express surface ligands for activating receptors (squiggly arrow in figure) that activate intracellular microbicidal mechanisms. If T cells cannot be activated at the site of infection, they will not contribute to control of the infection.



In seguito al riconoscimento dell'antigene presentato dai macrofagi i linfociti T mediano diverse funzioni effettrici. In particolare i Th1 producono oltre all'IFN- γ , TNF- α e chemochine.

Effetti dell'IFN- γ sui macrofagi



L'IFN- γ sui macrofagi induce:

Maggiore espressione delle molecole

MHC=maggior riconoscimento da parte delle cellule T

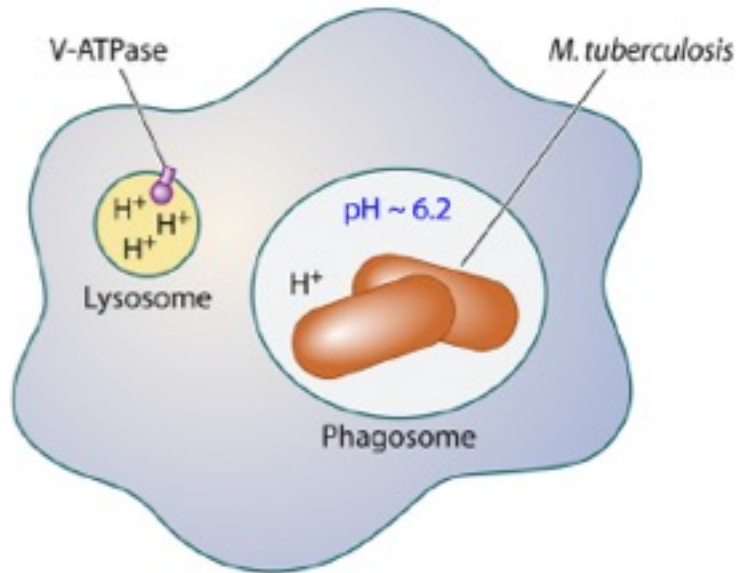
maggiore attività

antimicrobica: aumento della sintesi di iNOS e attivazione NADPH

ossidasi aumento della maturazione del

fagosoma. maggiore produzione di citochine.

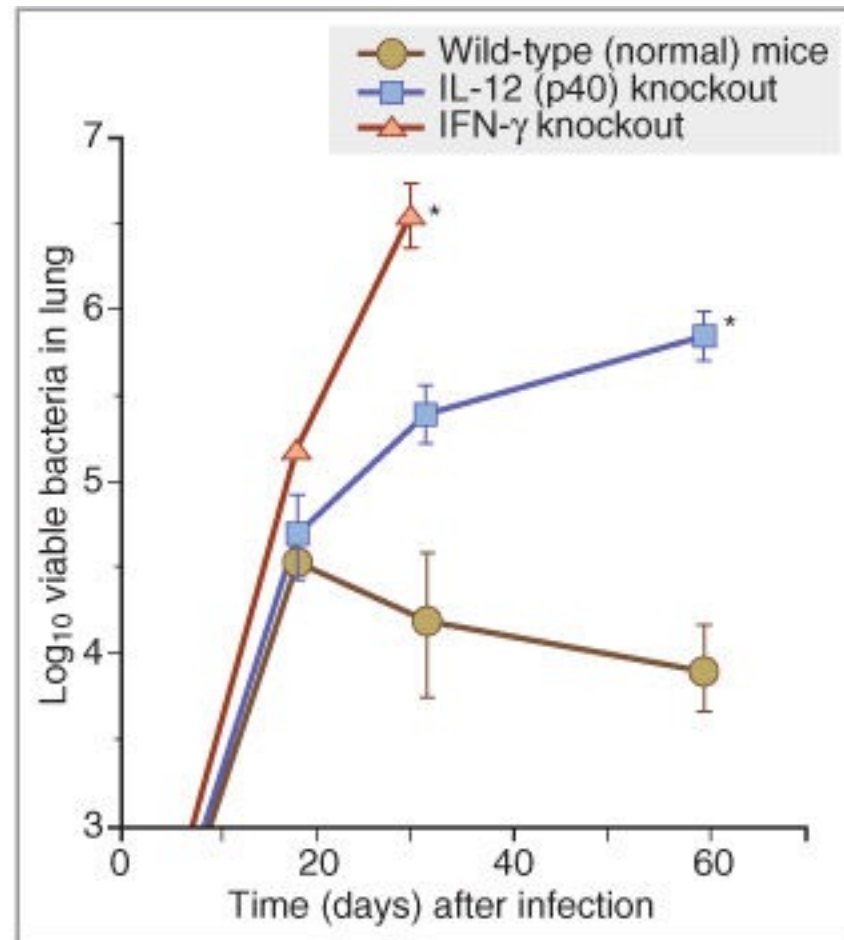
Meccanismi microbicidi rilevanti nella eliminazione di *M.tuberculosis* nei macrofagi murini attivati



Il trattamento dei macrofagi murini con IFN- γ prima dell'infezione con *M. tuberculosis* aumenta in modo significativo l'uccisione dei batteri intracellulari attraverso l'induzione **della ossido nitrico sintasi** (catalizza la conversione dell'arginina in citrullina con liberazione di ossido nitrico diffusibile) con produzione delle specie reattive dell'azoto. L'IFN- γ aumenta la **maturazione del fagosoma**.

L'IFN- γ **attiva l'autofagia** e rimuove il blocco di *M. tuberculosis* negli endosomi precoci dirigendoli verso l'autofagosoma.

L'IL-12 e l'IFN- γ sono necessari nel controllo dell'infezione da parte di *M. tuberculosis*



Il pathway IL-12/IFN- γ svolge un ruolo fondamentale nell'infezione da *M. tuberculosis*.

Questo pathway lega l'immunità innata alla risposta adattativa contro *M. tuberculosis* dominata dai linfociti Th1.

La risposta immune protettiva verso *M. tuberculosis* è mediata dai linfociti T CD4+ produttori IFN- γ

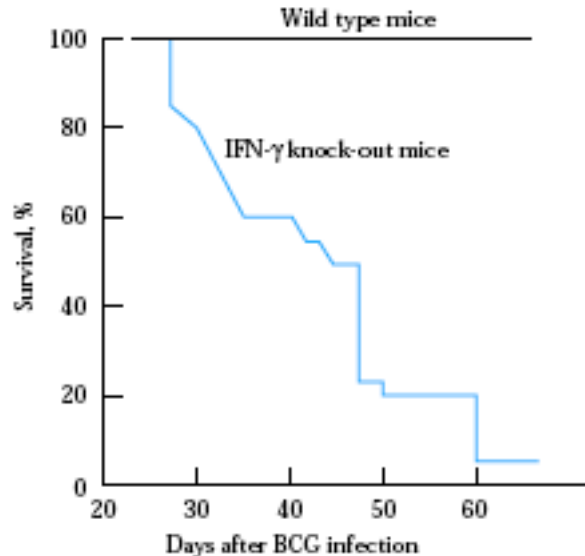
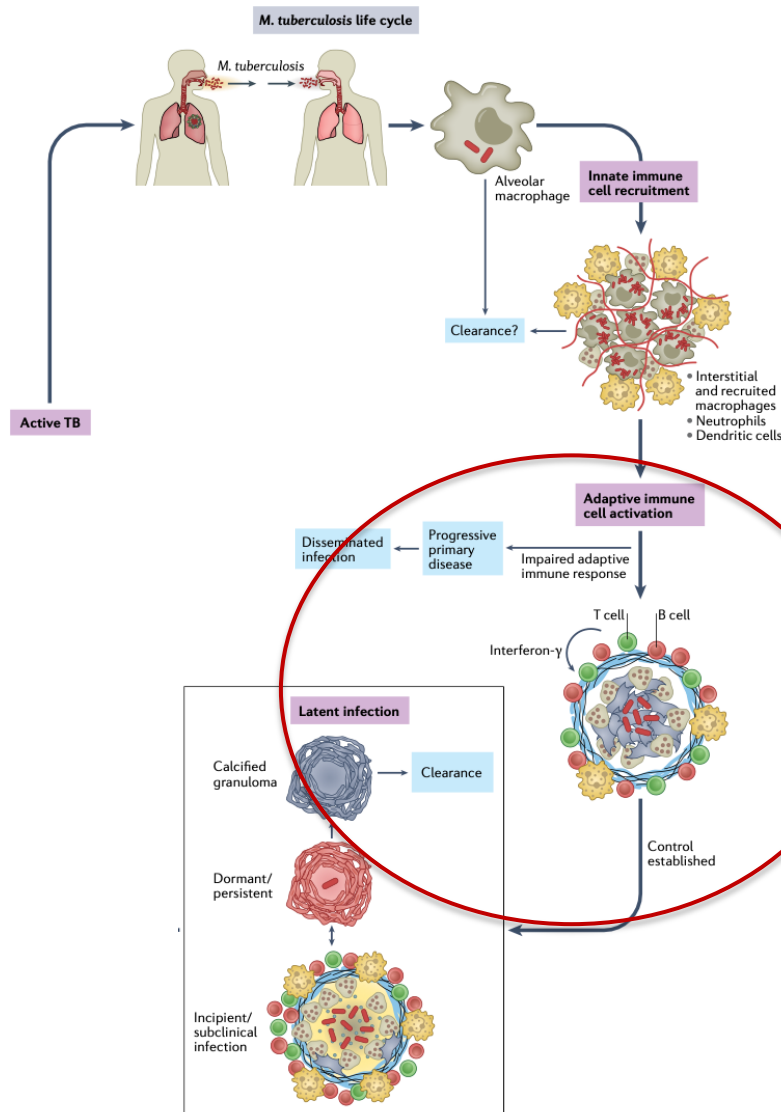


FIGURE 16-19 Experimental demonstration of the role of IFN- γ in host defense against intracellular pathogens. Knockout mice were produced by introducing a targeted mutation in the gene encoding IFN- γ . The mice were then infected with 10^7 colony-forming units of attenuated *Mycobacterium bovis* (BCG) and their survival monitored. [Adapted from D. K. Dalton et al., 1993, *Science* 259:1739.]

I topi KO per l'IFN- γ non sono in grado di controllare infezioni anche a basse dosi di *M.tuberculosis*.

In assenza di IFN- γ si osserva una replicazione incontrollata del batterio e distruzione tissutale che determina la morte.

Meccanismo del controllo dell'infezione da parte della immunità adattativa



Una risposta adattativa efficace è necessaria per prevenire la forma disseminata di infezione da *M. tuberculosis*.

In presenza di una risposta immune efficace si forma il granuloma tubercolare maturo che controlla e in alcuni casi elimina l'infezione.

I linfociti T CD4+ e il TNF- α sono necessari per la formazione del granuloma tubercolare.

Gli individui infettati da HIV con disfunzioni delle cellule T non sono in grado di formare un granuloma ben organizzato.

Struttura del granuloma tubercolare

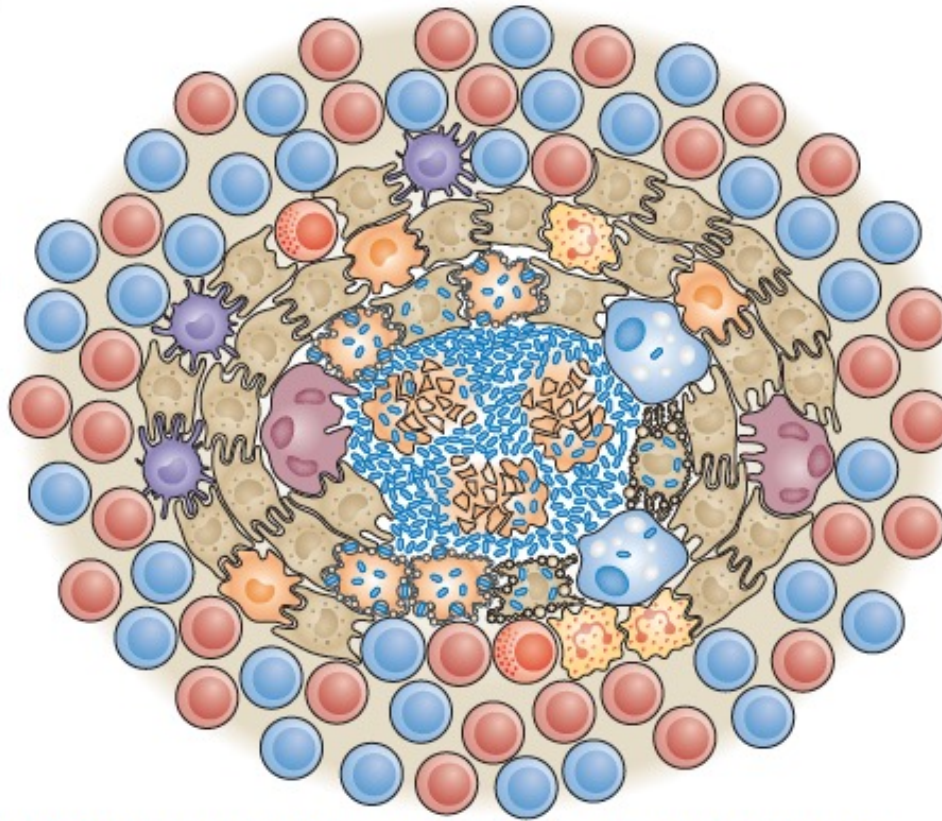
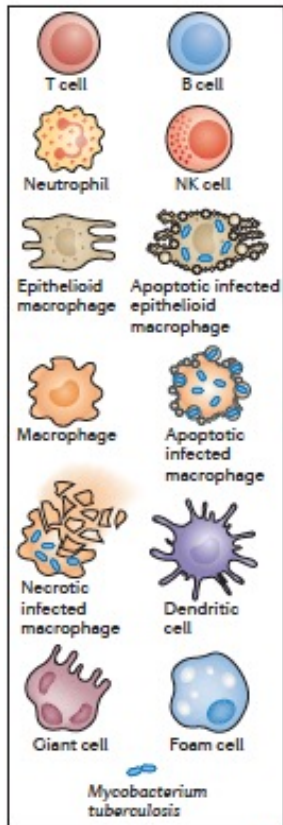


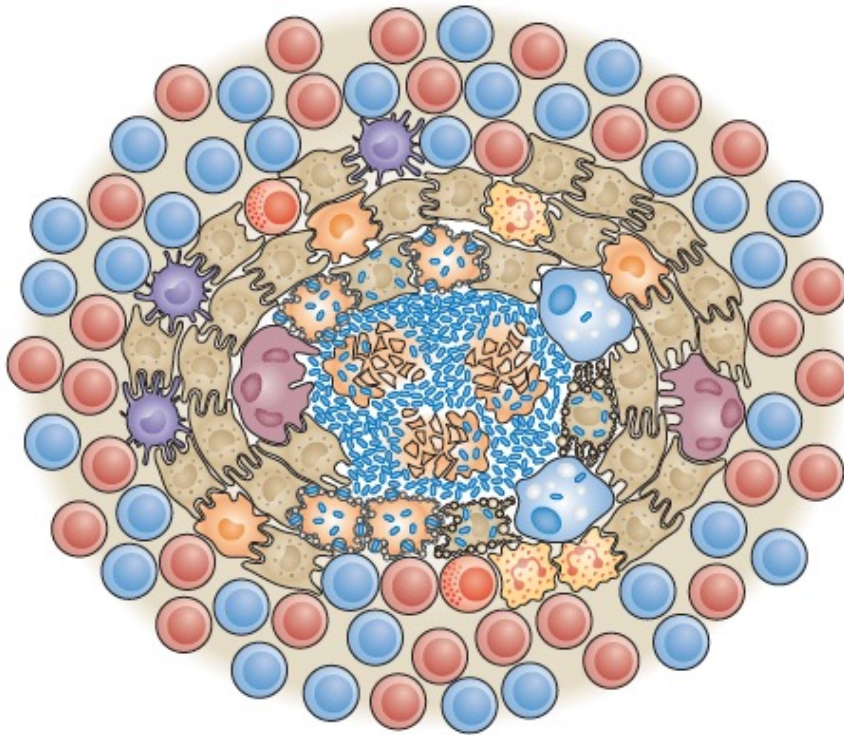
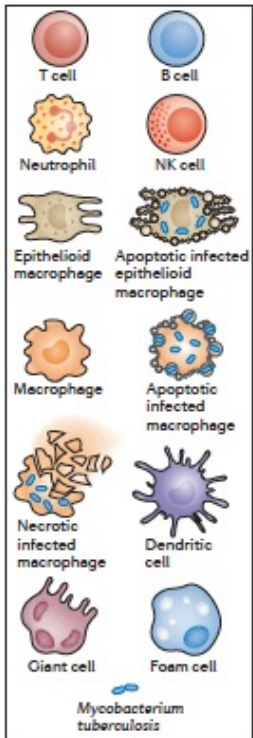
Figure 1 | Structure and cellular constituents of the tuberculous granuloma. The tuberculous granuloma at its most basic is a compact, organized aggregate of epithelioid cells—macrophages that have undergone a specialized transformation to have tightly interdigitated cell membranes that link adjacent cells. Epithelioid cells can be highly phagocytic but in some cases do not contain bacteria at all. Granuloma macrophages can also fuse into multinucleated giant cells or differentiate into foam cells, which are characterized by lipid accumulation. Foam cells have been noted to be most frequently located at the rim of the necrotic centre of a mature tuberculous granuloma. The consequences of these changes are not well understood, but in general foam cells and multinucleated giant cells have been reported to contain only a few bacteria, if any. Bacteria are most commonly present in the central necrotic areas in which dead and dying macrophages can be seen. Many other cell types also populate the granuloma, such as neutrophils, dendritic cells, B and T cells, natural killer (NK) cells, fibroblasts and cells that secrete extracellular matrix components. Finally, the epithelial cells surrounding the granuloma (not shown) are now thought to participate in its formation also.

Il granuloma tubercolare è un aggregato compatto di macrofagi maturi. All'interno sono presenti macrofagi infettati circondati da macrofagi non infetti.

Altre cellule quali i monociti e i linfociti T e B circondano i macrofagi. Il granuloma è delimitato da una capsula fibrotica costituita da collagene e altre proteine della matrice extracellulare. Questa risposta tissutale è tipica della fase di contenimento dell'infezione

Il granuloma tubercolare

I macrofagi maturi del granuloma possono andare incontro a modificazioni morfologiche. Si possono fondere per formare cellule giganti. Possono differenziare in cellule schiumose che sono caratterizzate da un accumulo di lipidi. Possono trasformarsi in cellule epitelioidi in cui le cellule sono strettamente associate fra loro attraverso delle interdigitazioni della membrana plasmatica.



Funzione del granuloma

Diverse evidenze indicano che il granuloma tubercolare rappresenta una struttura finalizzata al contenimento dell'infezione.

- Presenza di granulomi guariti e calcificati in individui sani

- Associazione fra ipersuscettibilità all'infezione da *M. tuberculosis*, in individui con immunodeficienze in IFN- γ , IL-12 e scarsa presenza di granulomi.

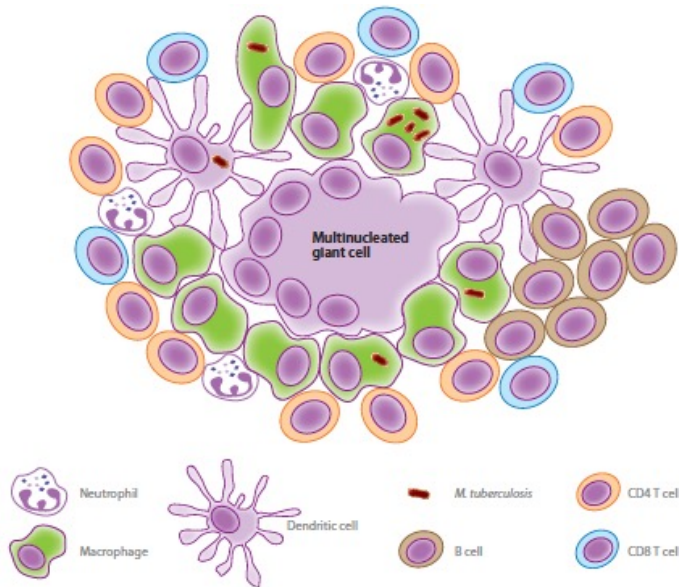
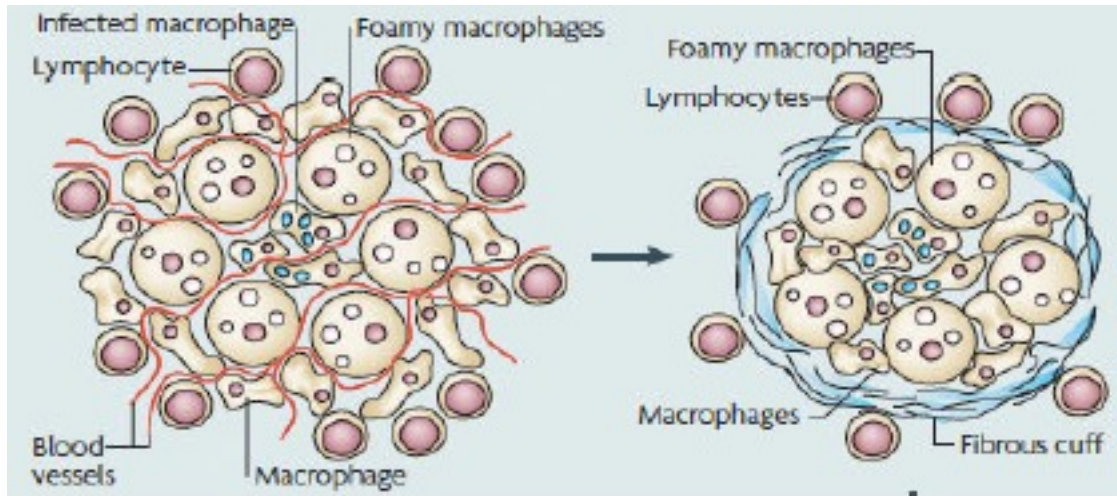


Figure 4

The cellular composition of a representative *Mycobacterium tuberculosis* granuloma. Individual granulomas can exhibit diverse morphologies, including striking areas of central caseous necrosis. The cells depicted have been identified in human granulomas, as well as in those of experimentally infected animals. A characteristic finding is that a small minority of the macrophages and dendritic cells in granulomas are infected by *M. tuberculosis*.

Maturazione del granuloma

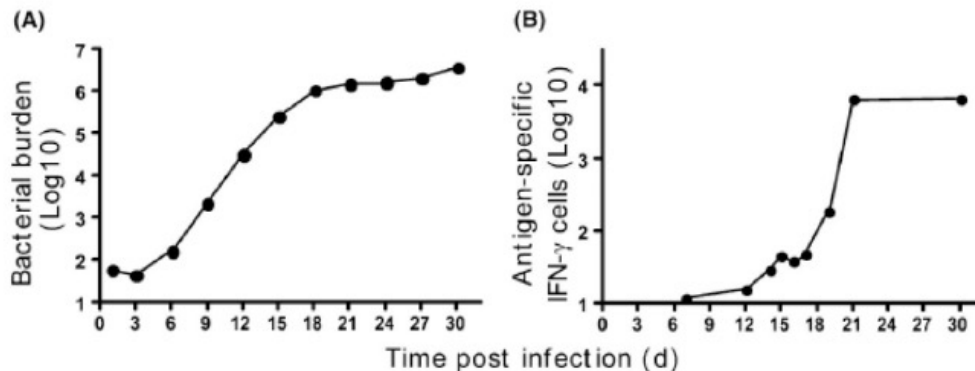


Nel modello classico la formazione del granuloma richiede l'immunità adattativa.

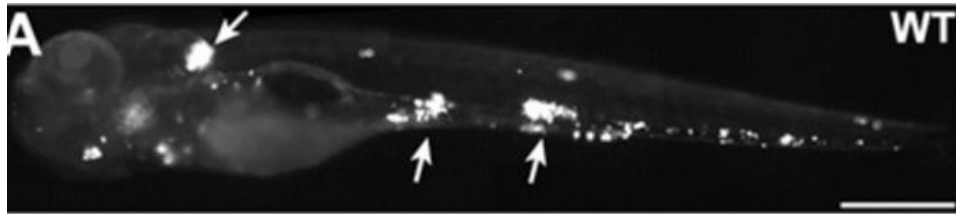
In seguito alla migrazione dei linfociti Th1 dal linfonodo al sito dell'infezione il granuloma si organizza strutturalmente con i macrofagi infettati all'interno circondati da linfociti T all'esterno.

Per questo la risposta adattativa è stata considerata essenziale alla formazione del granuloma.

Il concetto che il granuloma limita l'infezione isolando il batterio ha dominato la letteratura medica e immunologica per molti anni.

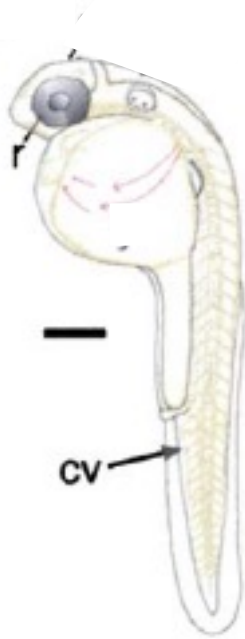


La formazione del granuloma avviene indipendentemente dalla immunità adattativa



Studi nell'embrione di zebrafish hanno permesso di visualizzare gli eventi cellulari nella formazione del granuloma. Tali studi hanno dimostrato che nell'embrione di zebrafish, *Mycobacterium marinum* induce la formazione del granuloma indipendentemente dall'immunità adattativa e sfrutta il nascente granuloma per proliferare e diffondere nell'ospite aumentando la sua virulenza.

Il modello dello zebrafish per lo studio della tubercolosi



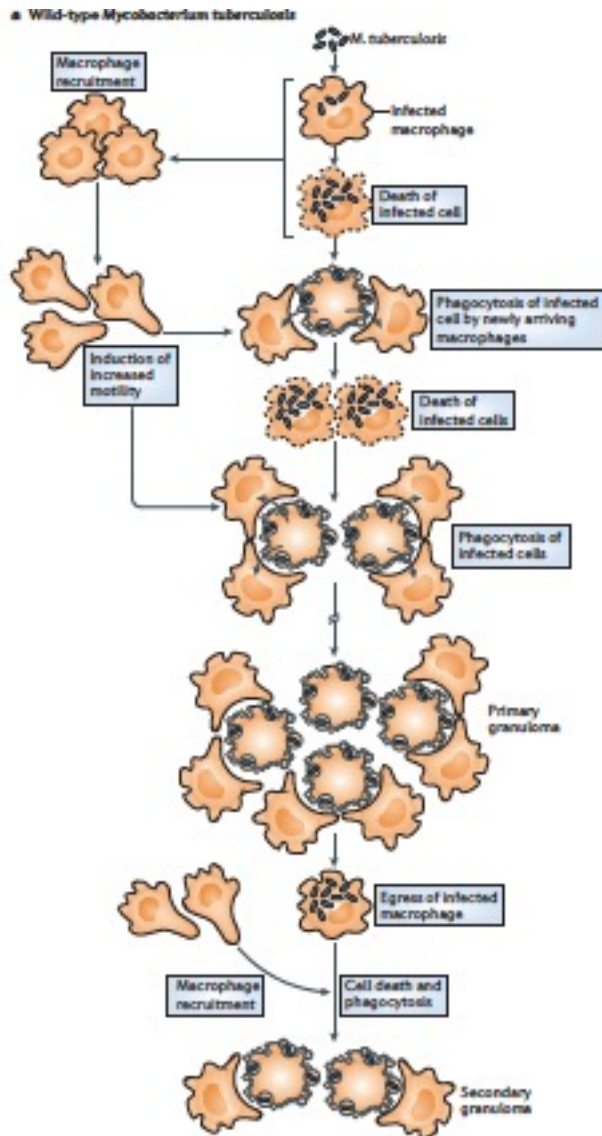
Il *Mycobacterium Marinum* è un patogeno naturale dei pesci, anfibi e rettili in cui causa una malattia simile alla tubercolosi.

Nell'uomo produce una infezione granulomatosa che è istologicamente simile alla tubercolosi ma ristretta alle estremità del corpo.

Lo zebrafish rappresenta un modello della tubercolosi che presenta molti vantaggi. Infatti permette di dissezionare il contributo dell'immunità innata e adattativa alla patogenesi e alla protezione della malattia grazie all'utilizzo di mutanti genetici e all'analisi microscopica dell'intero animale.

La trasparenza dell'embrione permette l'utilizzo di tecniche di visualizzazione.

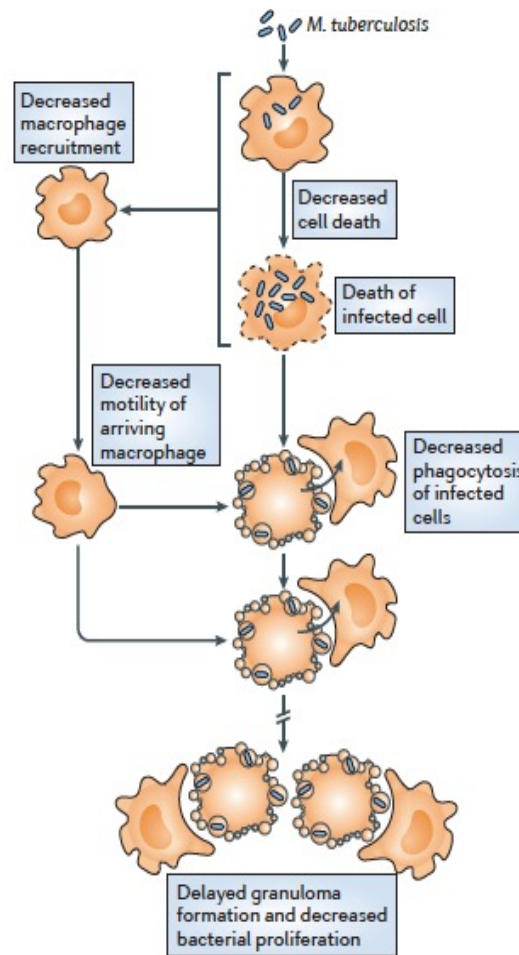
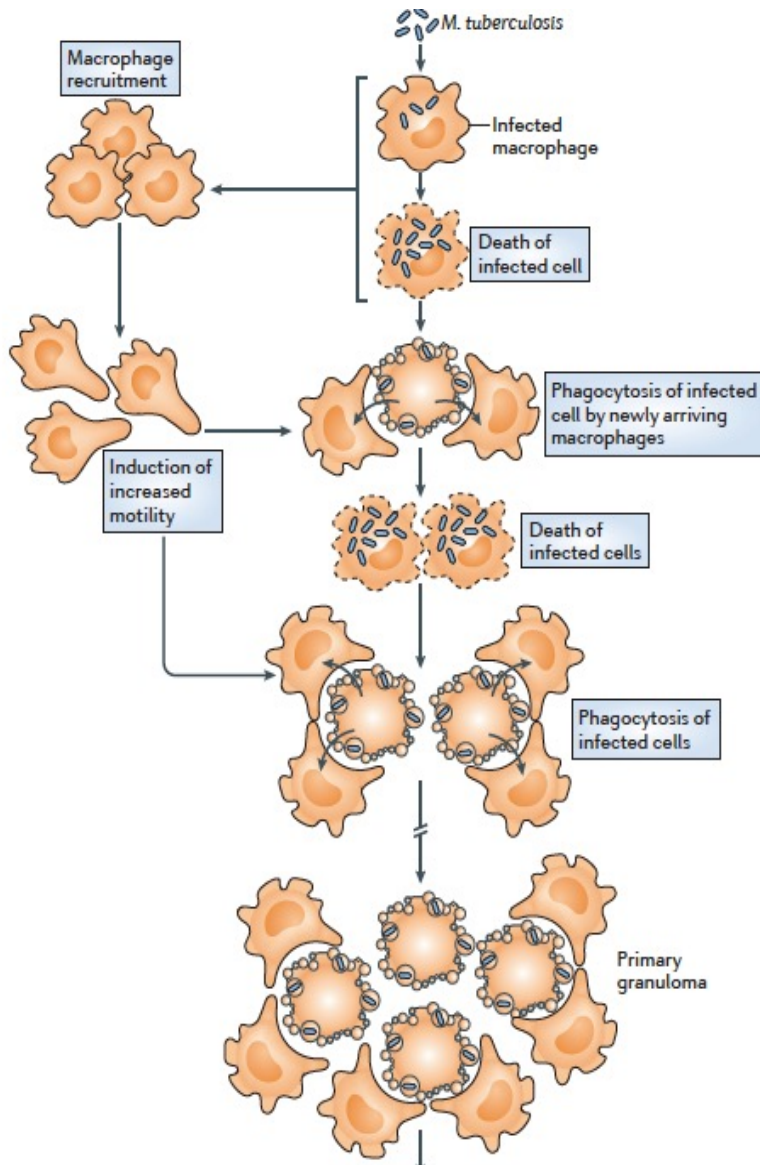
Proliferazione e diffusione del batterio attraverso il granuloma



Immagini dinamiche nelle larve di zebrafish hanno dimostrato che i macrofagi si muovono attivamente attorno al granuloma in formazione. Inizialmente i macrofagi infettati dai *M. tuberculosis* reclutano nuovi macrofagi.

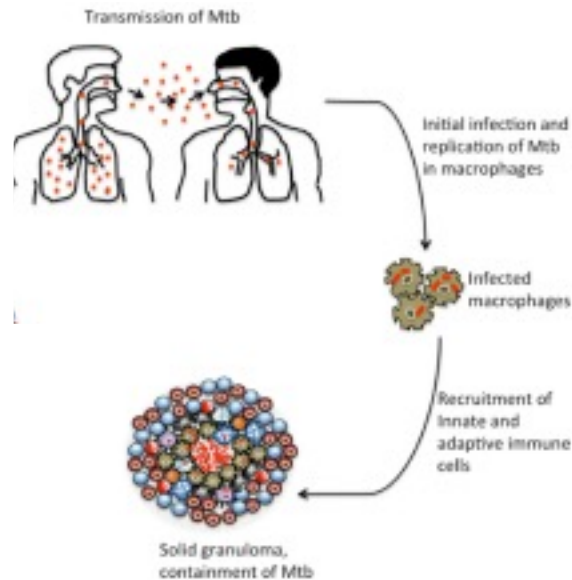
Le cellule infettate vanno incontro a morte e sono fagocitate dai macrofagi neoreclutati. Dopo una ulteriore crescita batterica anche queste cellule andranno incontro a morte e saranno fagocitate da altri macrofagi. Nella formazione del granuloma i macrofagi infettati vanno incontro ad apoptosi.

L'assenza del fattore di virulenza RD1 in *M. tuberculosis* ritarda la formazione del granuloma e riduce la proliferazione del batterio nell'ospite



La regione di differenza RD1 è un locus che è presente in *M. tuberculosis* ma non nel genoma di *M. Bovis* (BCG).

Funzioni del granuloma



La formazione del granuloma avviene sin dall'inizio dell'infezione da parte di *M. tuberculosis*. Tale struttura è costituita inizialmente da un aggregato di macrofagi infetti che il batterio sfrutta per poter proliferare nell'ospite. In seguito all'induzione della risposta adattativa il granuloma acquisisce l'azione di contenimento.

Ciclo vitale patogenico di *M. tuberculosis*

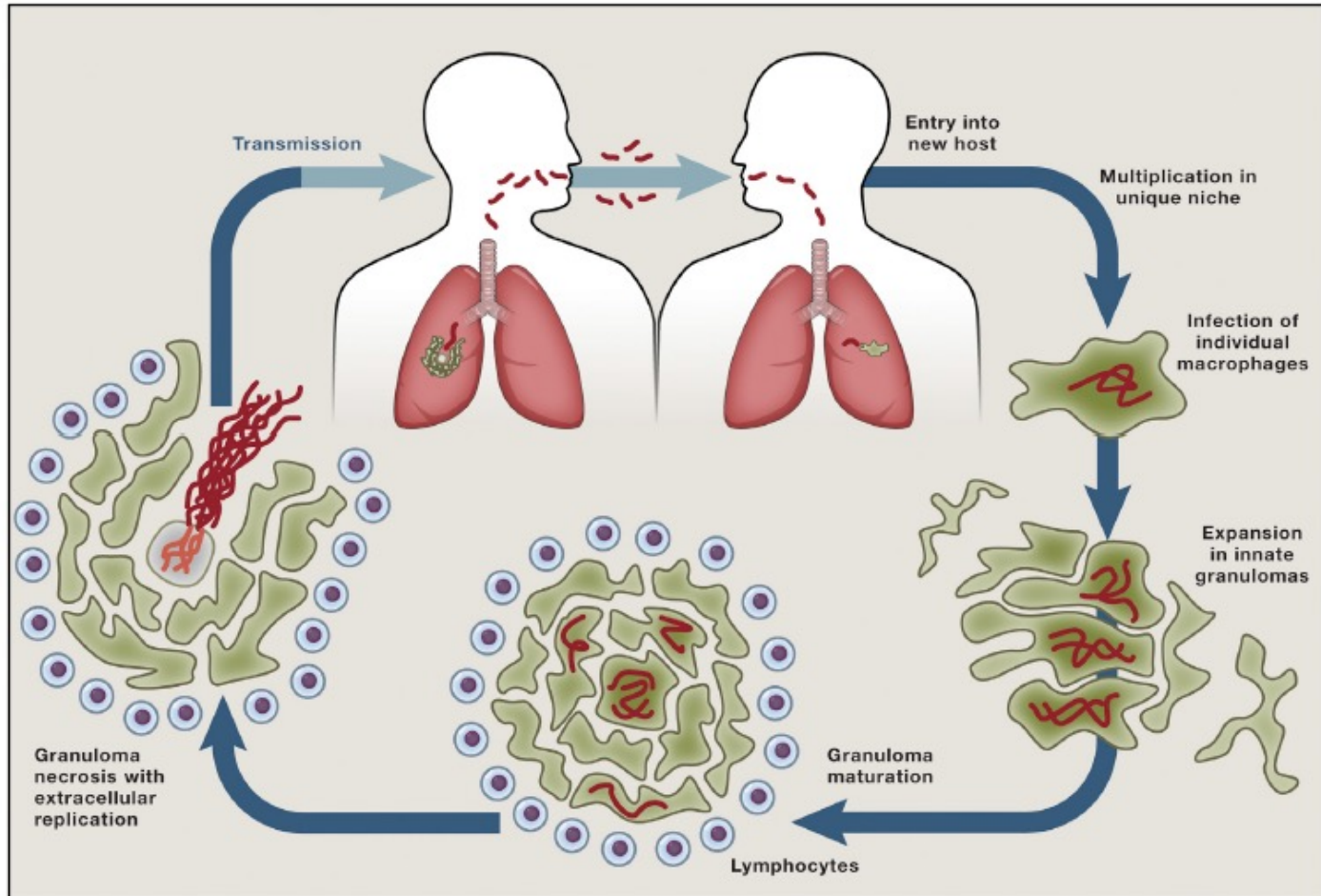
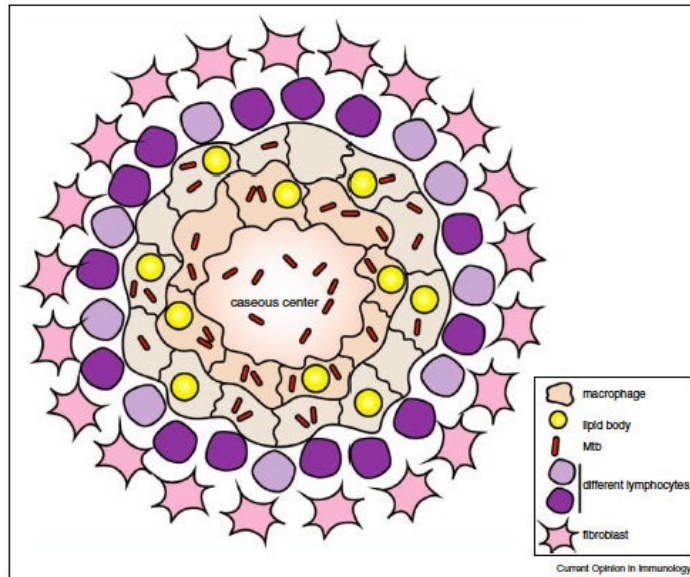


Figure 1. Pathogenic Life Cycle of *M. tuberculosis*

M. tuberculosis infection initiates when fine aerosol particles containing the bacteria coughed up by an individual with active disease are deposited in the lower lungs of a new host. The bacteria recruit macrophages to the surface of the lung, which become infected, and serve to transport the bacteria across the lung epithelium to deeper tissues. A new round of macrophage recruitment to the original infected macrophage is initiated, forming the granuloma, an organized aggregate of differentiated macrophages and other immune cells. The granuloma in its early stages expands infection by allowing bacteria to spread to the newly arriving macrophages. As adaptive immunity develops, the granuloma can restrict bacterial growth. However, under many circumstances, the infected granuloma macrophages can undergo necrosis, forming a necrotic core that supports bacterial growth and transmission to the next host.

Beneficio biologico del granuloma

Figure 3

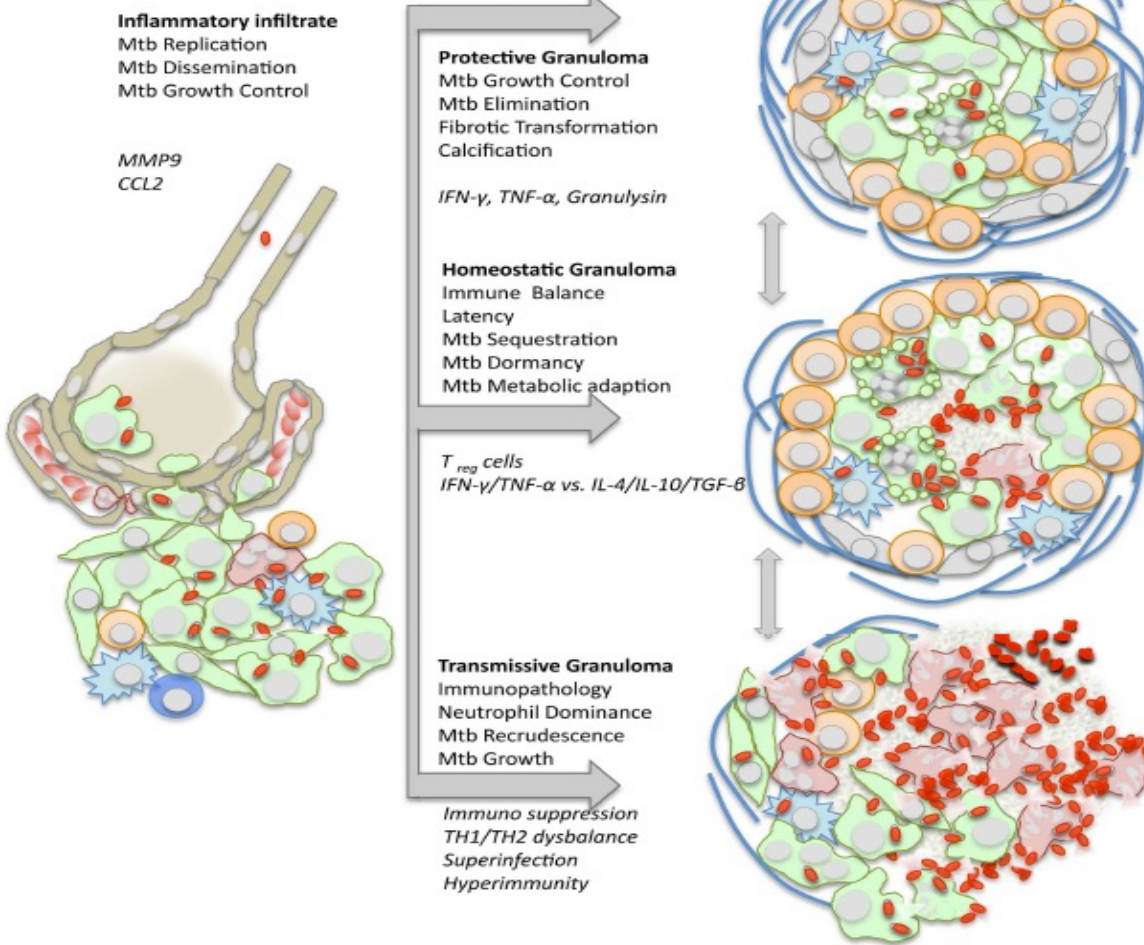


Complex granulomas contain mycobacteria long term. Mature mycobacterial granulomas in many hosts contain rings of macrophages around a necrotic caseous center. Foam cells, which contain large lipid bodies (shown in yellow), as well as multinucleated giant cells and epithelioid-like macrophages are some of the specialized macrophages in these regions. Multiple kinds of lymphocytes are present in an outer boundary, and fibroblasts are also present in mature granulomas.

Il granuloma beneficia sia il batterio garantendo l'infezione persistente sia l'ospite perché permette il contatto fra cellule presentanti l'antigene infettate (macrofagi e DC) e cellule immuni che possono controllare l'infezione.

Il primo stadio nella formazione del granuloma non è di per se protettivo anzi si pensa possa favorire la diffusione del batterio. Il granuloma tardivo diventa protettivo per l'ospite.

Possibili evoluzioni del granuloma tubercolare

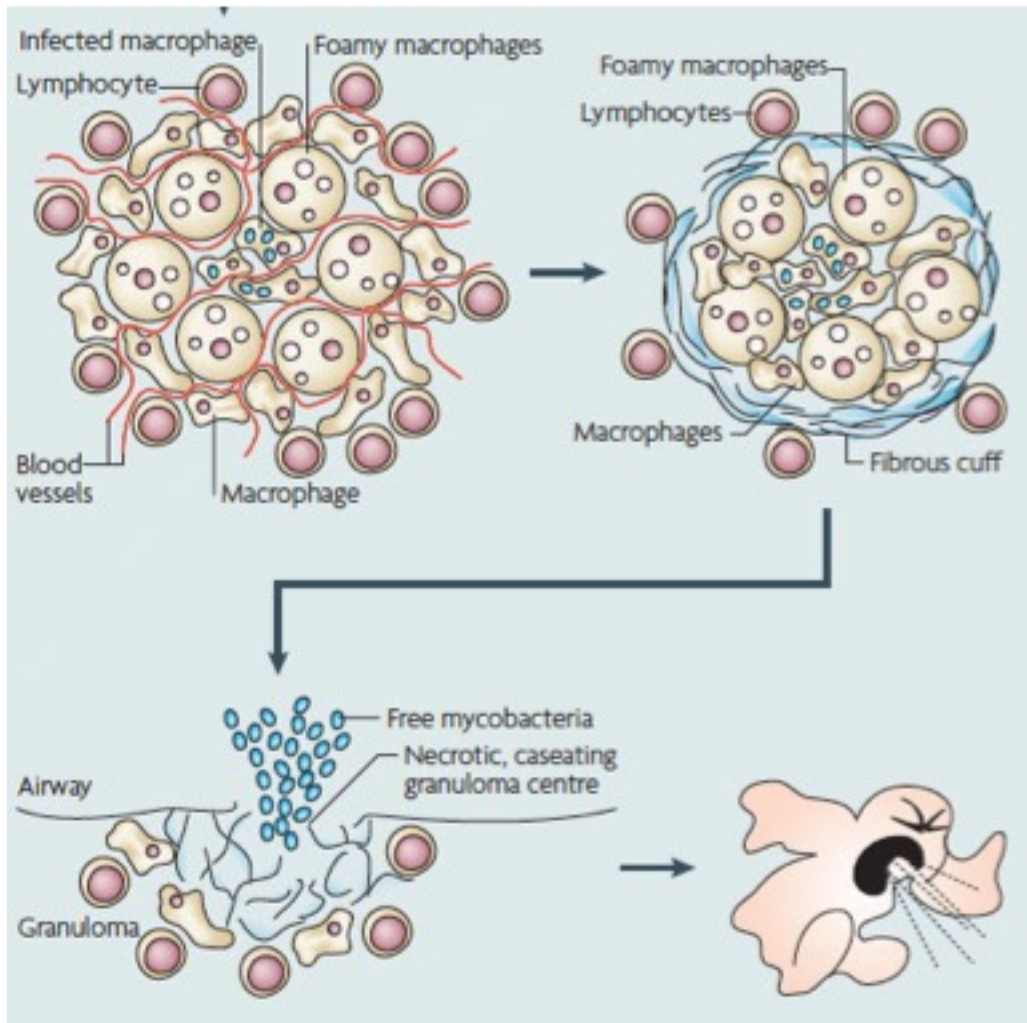


Dati epidemiologici indicano che in seguito allo sviluppo della risposta T questa possa in alcuni casi determinare l'eliminazione del micobatterio nel granuloma.

In altri casi il batterio può persistere in uno stato dormiente.

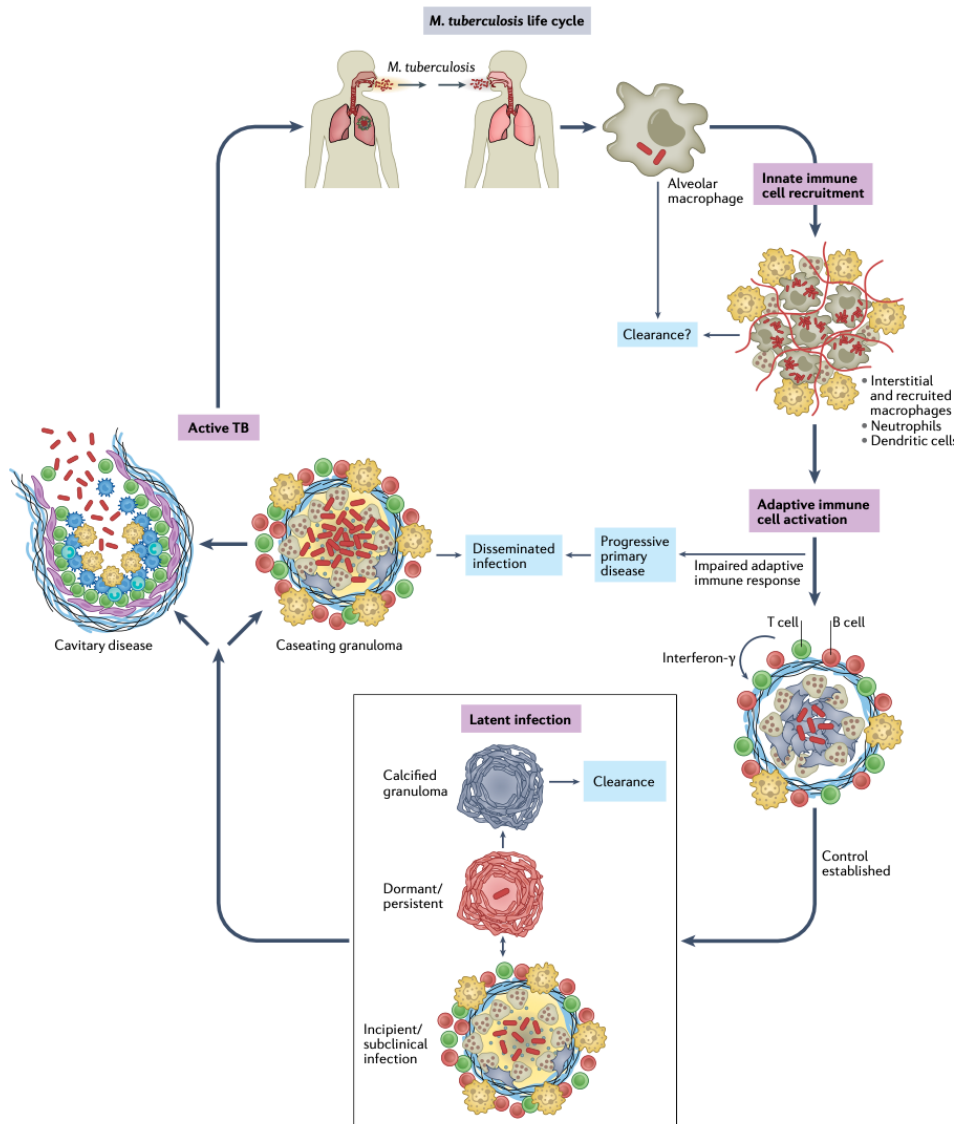
L'infezione nella tubercolosi latente può riattivarsi e progredire in TB attiva. Dati epidemiologici indicano che la trasmissione del micobatterio della tubercolosi avviene più frequentemente negli individui con granulomi organizzati che presentano una necrosi all'interno.

La rottura del granuloma in seguito a qualsiasi condizione che riduce le cellule T CD4+ facilita la diffusione aerea del batterio



L'azione di contenimento svolta dal granuloma tubercolare fallisce in quelle condizioni che riducono o alterano le funzioni delle cellule T CD4+ (malnutrizione, invecchiamento, infezione da HIV). In seguito a tali cambiamenti dello stato del sistema immune il granuloma va incontro a caseazione si rompe e libera migliaia di batteri vivi nelle vie aeree dell'individuo infetto.

Ciclo vitale *M. tuberculosis*



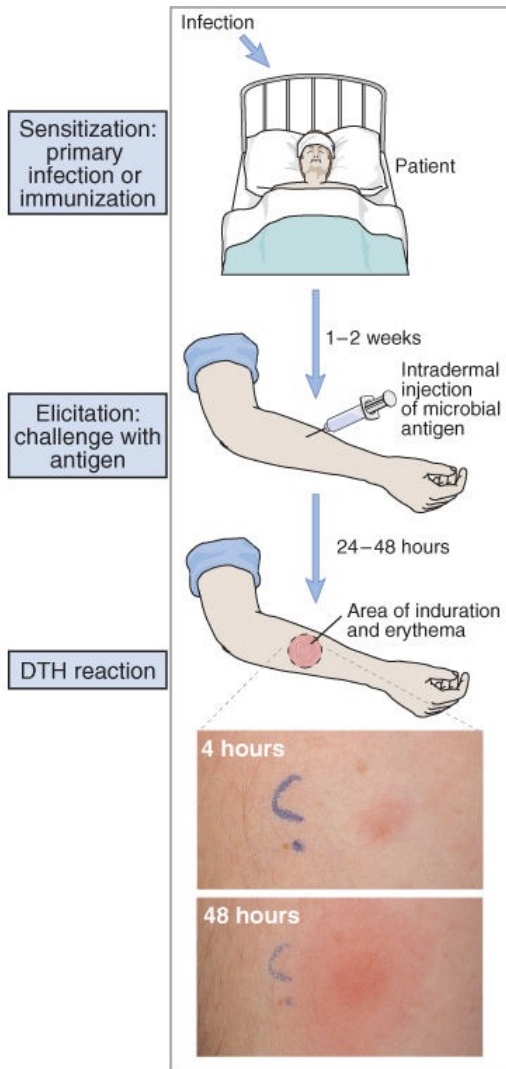
M. tuberculosis viene trasmesso via aerosol da un individuo con la forma attiva della tubercolosi. Le prime cellule ad essere infettate sono i macrofagi alveolari che dopo essere stati infettati migrano nell'interstizio polmonare. I macrofagi infettati richiamano altri macrofagi, i neutrofili e le cellule dendritiche sostenendo la replicazione del batterio.

Non è chiaro se in alcuni individui la risposta immune innata elimina il batterio. Le cellule dendritiche migrano nei linfonodi dove sono attivati i linfociti T specifici per il micobatterio.

I linfociti T migrano nel punto dell'infezione e sono necessari per il contenimento dell'infezione e per prevenire l'infezione disseminata. Si sviluppa il granuloma maturo.

In presenza di un sistema immune efficiente la maggior parte degli individui sviluppa una infezione latente. Il 5-10% degli individui infetti può sviluppare infezione attiva.

Sequenza di eventi delle reazioni DTH



La reazione DTH indotta dall' inoculo intradermico del PPD in un individuo sensibilizzato si sviluppa in 24-48 ore.

Viene utilizzata per verificare se un individuo ha sviluppato una risposta immune contro il Micobatterio della tubercolosi (Skin test; tuberculin test).

Nelle prime 4 ore si accumulano nelle venule post capillari del sito di inoculo i neutrofili.

Dopo 12 ore compare un infiltrato linfo monocitario in sede perivasale. Le cellule endoteliali che rivestono i capillari si rigonfiano e diventano più permeabili alle macromolecole presenti nel plasma. In seguito alla fuoriuscita del fibrinogeno si avrà la sua conversione in fibrina. L'infiltrato e la deposizione di fibrina determinano il rigonfiamento e l'indurimento del tessuto. Il TNF e l'IFN- γ provocano alterazioni morfologiche nelle cellule endoteliali favorendo la fuoriuscita dal letto capillare di macromolecole quali il fibrinogeno.

Nuovi saggi per la diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis*

Table1: Differences in Currently Available IGRAs

	QFT-GIT	T-Spot
Initial Process	Process whole blood within 16 hours	Process peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) within 8 hours, or if T-Cell Xtend® is used, within 30 hours.
<i>M. tuberculosis</i> Antigen	Single mixture of synthetic peptides representing ESAT-6, CFP-10 and TB7.7	Separate mixtures of synthetic peptides representing ESAT-6 and CFP-10
Measurement	IFN-g concentration	Number of IFN-g producing cells (spots)
Possible Results	Positive, negative, indeterminate	Positive, negative, indeterminate, borderline

Il TST (tuberculin skin test) è stato inizialmente effettuato utilizzando un estratto di *M. tuberculosis*, successivamente l'estratto è stato sostituito con il protein purified derivative (PPD) di *M. tuberculosis*. Tuttavia poiché il PPD contiene più di 200 antigeni che sono in comune con molti micobatteri ambientali e non tubercolari questo saggio ha una bassa specificità.

Più recentemente sono stati sviluppati saggi (IGRA test=test di rilascio dell'IFN-gamma) che utilizzano antigeni specifici di *M. tuberculosis* (ESAT-6).

La reattività a questi antigeni è valutata in termini di produzione dell'IFN- γ da parte dei linfociti T dell'individuo.

La reazione DTH rappresenta il danno tissutale scatenato dai macrofagi attivati in risposta ai microrganismi intracellulari

I macrofagi attivati innescano il processo infiammatorio attraverso la produzione di IL-1, TNF- α prostaglandine, leucotrieni. Essi mediano anche il rimodellamento tissutale.

