

# Il ruolo del microbiota nella malattia tubercolare

*The role of microbiota in Tuberculosis*

**Fernanda Chiera<sup>1\*</sup>, Pasquale Comberiati<sup>2\*</sup>, Alessandro Di Gangi<sup>2</sup>, Stefania Arasi<sup>3</sup>, Simona Barni<sup>4</sup>, Davide Caimmi<sup>5</sup>, Carla Mastrorilli<sup>6</sup>, Francesco Paravati<sup>1&</sup>, Umberto Pelosi<sup>7&</sup>**

<sup>1</sup> UOC di Pediatria, Ospedale San Giovanni di Dio, Crotone

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Pediatria, Università di Pisa

<sup>3</sup> Area di Ricerca Traslationale in Specialità Pediatriche, Unità di Allergologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma

<sup>4</sup> Unità di Allergologia, Dipartimento di Pediatria, Ospedale Pediatrico Meyer, Firenze

<sup>5</sup> Unità di Allergologia, Centro Ospedaliero Universitario di Montpellier, Montpellier (Francia)

<sup>6</sup> Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedaliero Universitaria Consorziale Policlinico di Bari, Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, Bari

<sup>7</sup> UOC di Pediatria, Ospedale Santa Barbara, Iglesias

\* primo autore

& autore senior

**Corrispondenza:** Fernanda Chiera **e-mail:** fernandachiera@hotmail.it

**Riassunto:** La tubercolosi è una delle malattie infettive più comuni al mondo. Il microbiota umano può avere un ruolo nella fisiopatologia della tubercolosi, nella risposta alla terapia, negli outcome clinici e post-trattamento. Questo lavoro esamina le risposte immunitarie dell'ospite verso l'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*, il ruolo del microbiota intestinale e polmonare nel modulare la suscettibilità alla tubercolosi, le alterazioni del microbiota durante la tubercolosi e in corso di terapia.

**Parole chiave:** Tubercolosi, microbiota, asse intestino-polmone.

**Summary:** Tuberculosis is one of the most common infectious diseases worldwide. Emerging evidences indicate a possible role of the human microbiota in the pathophysiology of tuberculosis, response to therapy, clinical and post-treatment outcomes. In this review, we focus on the host immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection, role of gut and lung microbiota in modulating tuberculosis susceptibility, alterations of the microbiota and the effects of therapy on the microbiota.

**Keywords:** Tuberculosis, microbiota, gut-lung axis.

## EPIDEMIOLOGIA DELLA TBC IN ETÀ PEDIATRICA E STORIA NATURALE DELLA MALATTIA

La tubercolosi (TBC) è una delle malattie infettive più diffuse nel mondo. Nel 2018 ci sono stati circa 10 milioni di nuovi casi con 1.4 milioni di morti. In età pediatrica, la TBC rappresenta circa il 10-20% di tutti i casi; la sua esatta prevalenza è ancora sottovalutata a causa di difficoltà diagnostiche. La fascia d'età 0-4 anni presenta un più elevato rischio di malattia disseminata (meningite, miliare) e di mortalità.

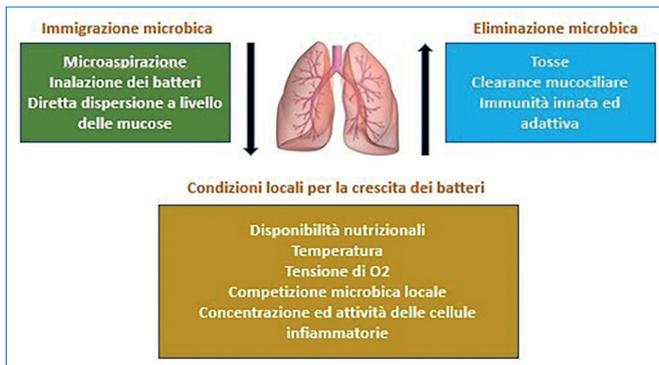
Il *Mycobacterium Tuberculosis* (MT), patogeno intracellulare, si trasmette da una persona adulta malata attraverso l'aria espirata, mediante l'emissione con gli starnuti e/o con i colpi di tosse di goccioline di secreto infetto. L'esposizione conduce a due eventi: l'eliminazione del germe e la sua persistenza; circa il 10% dei soggetti infettati ha una probabilità di sviluppare una malattia attiva. L'età, le ridotte difese immunitarie, la malnutrizione, il deficit della vitamina D, la carica batterica sono i più importanti fattori per la rapida replicazione del MT e la progressione della malattia (1).

### Il microbiota polmonare

Il polmone dei soggetti sani è colonizzato da numerosi microorganismi: batteri, virus, funghi. Sono state identificate diverse specie di batteri: 1) phylum: Firmicutes, Bacteroides e Proteobacteria, 2) genere: *Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacteria* e *Streptococcus*, con la presenza di

**Tab. 1:** Composizione del microbiota polmonare nel soggetto sano.  
*Composition of the pulmonary microbiota in healthy subjects.*

<b>Phylum</b>	Bacteroides	Firmicutes	Proteobacteria
<b>Genere</b>	Prevotella Bacteroides	Veillonella Streptococcus Staphylococcus	Pseudomonas Haemophilus Moraxella Neisseria Acinetobacter



**Fig. 1:** Fattori che regolano il microbiota polmonare.  
*Factors modulating the lung microbiota.*

piccole quantità di potenziali patogeni come Haemophilus, 3) e funghi: Aspergillus, Cladosporium, Penicillium e Eurotium (Tabella 1). La composizione del microbiota polmonare dipende da alcuni fattori: 1) immigrazione microbica (microaspirazione, inalazione di microorganismi, dispersione diretta mucosale), 2) eliminazione microbica (tosse, clearance mucociliare, immunità innata ed adattativa), 3) condizioni di accrescimento regionale (disponibilità nutrizionali, temperatura, tensione di O<sub>2</sub>, competizione microbica locale, concentrazione ed attività delle cellule infiammatorie) (2) (Figura 1).

La perdita in ricchezza e in biodiversità del microbiota, un processo definito “disbiosi”, è associata ad una maggiore suscettibilità ai disturbi immuno-mediati nel corso della vita, quali le malattie infiammatorie intestinali e le malattie allergiche.

## INFLUENZA DEL MICROBIOTA NELLA RISPOSTA IMMUNE

La colonizzazione da parte di un microbiota intestinale “sano” nei primi anni di vita rappresenta un fattore determinante per la maturazione del sistema immunitario e il mantenimento della tolleranza immunologica. Sono stati riconosciuti molteplici meccanismi che consentono al microbiota intestinale di regolare la risposta immunitaria e viceversa (3).

### Interazioni tra microbiota intestinale e immunità innata

A livello intestinale, grazie all’azione del microbiota, si formano numerose molecole leganti i recettori toll-like (TLRs) e NOD-like (NLRs) e metaboliti ad azione immunomodulante, quali gli acidi grassi a catena corta (SCFA), che contribuiscono all’omeostasi immunitaria intestinale (4). I recettori TLRs sono coinvolti nella difesa dell’ospite contro microrganismi patogeni, regolano l’abbondanza e la composizione del microbiota intestinale e mantengono l’integrità dei tessuti e delle barriere mucose. I recettori NLRs contribuiscono a modulare la composizione del microbiota intestinale e l’omeostasi locale.

### Interazioni tra microbiota intestinale ed immunità adattativa

La disbiosi intestinale è associata anche ad alterazioni della risposta immunitaria adattativa mucosale, sia di tipo umorale che cellulo-mediata. In particolare:

1. Il microbiota regola la risposta immune adattativa attraverso le IgA secretorie (5).
2. Alcuni metaboliti prodotti dai batteri, tra cui gli SCFA, possono favorire la differenziazione delle cellule T naïve CD4<sup>+</sup> in Treg. Il sottogruppo Th17 è coinvolto sia nella protezione contro i patogeni che nei disordini infiammatori. La propensione infiammatoria dei Th17 è largamente determinata dal tipo di microbiota intestinale che ne induce la differenziazione (6).

3. I linfociti T CD8<sup>+</sup> (citotossici), fondamentali nell'eliminazione di patogeni intracellulari e cellule tumorali per mezzo degli SCFA di derivazione microbiotica, sono coinvolti nell'acquisizione delle funzioni di memoria (7).

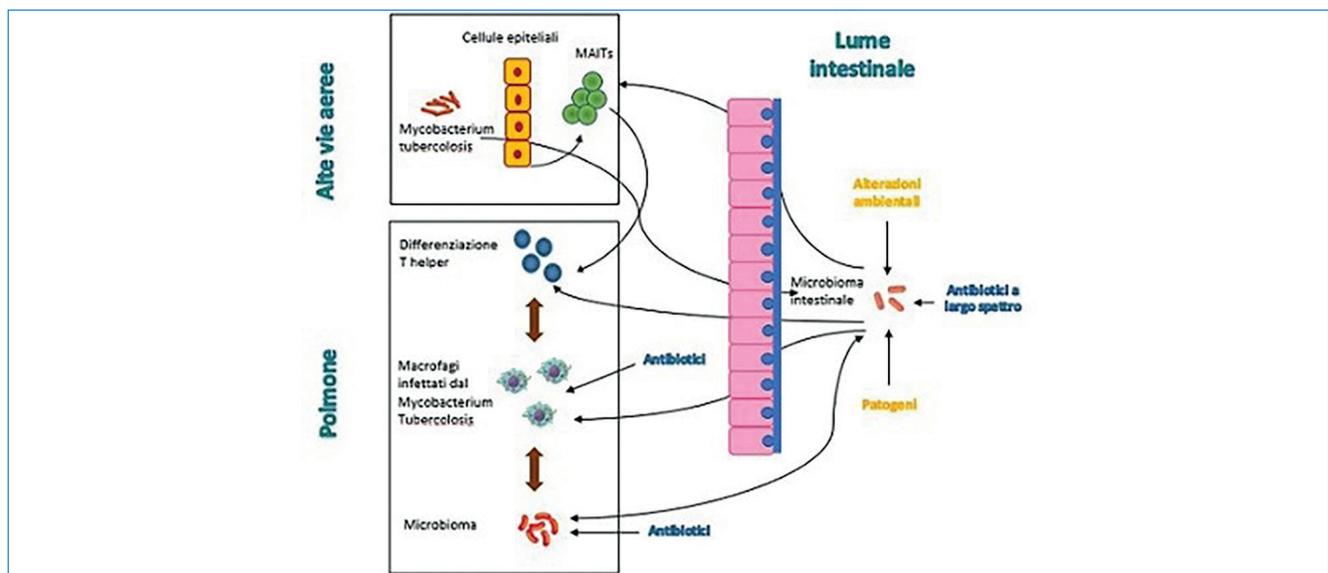
### ASSE INTESTINO-POLMONE NELLA TBC

Il microbiota intestinale gioca un ruolo cruciale nelle infezioni polmonari confermando l'esistenza di un cross-talk tra l'intestino e il polmone, il cosiddetto "asse intestino-polmone". Le sue interazioni si basano su due presupposti:

1. Alcune malattie respiratorie (es. asma e influenza) sono correlate a una disbiosi intestinale.
2. La modulazione dell'immunità locale e sistemica può favorire la protezione da parte del microbiota intestinale verso le infezioni polmonari (8).

È ipotizzabile che un'alterazione dell'asse intestino-polmone sia coinvolta nella patogenesi della TBC (Figura 2).

L'infezione da MT si associa ad alterazioni del microbiota intestinale, consistenti in una riduzione dei batteri produttori di SCFA. Inoltre, sono stati riscontrati elevati livelli di Actinobacteria e Proteobacteria nel microbiota intestinale dei pazienti con TBC ricorrente e livelli ridotti di Prevotella e di Clostridiales in coloro che avevano TBC primaria o ricorrente rispetto



**Fig. 2:** Visione schematica dell'asse intestino-polmone nella TBC. Alterazioni ambientali quali la dieta, l'uso di antibiotici ad ampio spettro e la colonizzazione da parte di batteri patogeni possono alterare la normale composizione del microbioma intestinale. *Mycobacterium tuberculosis* (MT), tramite meccanismi per lo più sconosciuti, è anch'esso in grado di modulare la diversità della flora intestinale. La risposta delle cellule epiteliali delle alte vie e dei linfociti T invariati residenti (MAITs) è modulata dal microbioma intestinale coadiuvando la risposta macrofagica all'infezione. Il microbioma intestinale è un forte modulatore della risposta T helper a livello polmonare e, come tale, potrebbe influire sulla capacità di eliminazione il MT da parte dei macrofagi attraverso l'aumento della produzione di IFN- $\gamma$ , IL-12 e di specie reattive dell'ossigeno. Metaboliti e altri mediatori sono tra i responsabili del mantenimento dell'equilibrio dinamico tra microbioma intestinale e polmonare.

*Schematic view of the gut-lung microbiota cross-talk in Tuberculosis. Environmental alterations such as diet, the use of broad-spectrum antibiotics, and colonization by pathogenic bacteria can alter the normal composition of the intestinal microbiota. Mycobacterium tuberculosis, through mostly unknown mechanisms, is also able to modulate the diversity of the intestinal flora. The response of upper pathway epithelial cells and resident invariant T lymphocytes (MAITs) is modulated by the gut microbiota supporting the macrophage response to infection. The intestinal microbiota is a strong modulator of the T helper response in the lung and, as such, could affect the ability of macrophages to eliminate Mycobacterium tuberculosis through the increase in the production of IFN- $\gamma$ , IL-12 and reactive oxygen species. Bacterial-derived metabolites and other mediators are among those responsible for maintaining the dynamic balance between the intestinal and lung microbiota.*

ai controlli sani. Il microbiota intestinale potrebbe influenzare la suscettibilità all'infezione tubercolare iniziale e la progressione da infezione latente a malattia attiva in diversi modi: (i) determinando differenze nei sottoinsiemi di cellule immunitarie o nella loro funzione, sia a livello intestinale che nelle vie aeree; (ii) influenzando l'assorbimento e l'efficacia dei farmaci usati per il trattamento della TBC; (iii) producendo antimicrobici o molecole immunomodulanti influenti sulla crescita del MT (9).

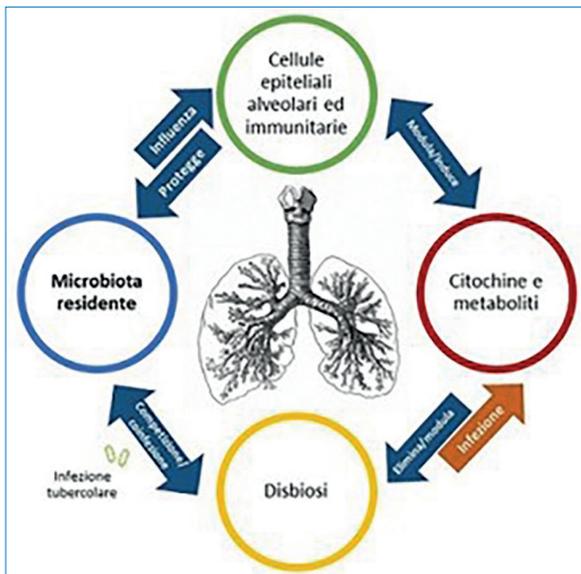
I dati disponibili sui cambiamenti nel microbiota polmonare indotti dall'infezione tubercolare sono limitati.

## INFLUENZA DEL MICROBIOTA INTESTINALE E POLMONARE NELLA PATOGENESI DELLA TBC

L'immunopatogenesi della TBC dipende da una complessa interazione tra subset T cellulari e citochine, mentre l'immunità umorale è coinvolta nella resistenza alla disseminazione della TBC e nel potenziamento delle citochine down-regolatorie. Durante la TBC polmonare attiva, la risposta immunitaria è circoscritta al polmone e caratterizzata da un'esuberante risposta dei linfociti Th1, con alti livelli di IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (10).

Solo recentemente è stato dimostrato il ruolo del microbiota nella patogenesi della TBC, nella risposta alla terapia, negli outcome clinici e negli esiti post-trattamento. Questo ruolo è sostenuto da complesse interazioni multifattoriali tra il patogeno, la flora commensale e l'ospite (Figura 3). Risultano particolarmente importanti i seguenti fattori:

1. la suscettibilità all'infezione e la progressione verso la TBC attiva è modificata dalla co-infezione intestinale da *Helicobacter*;
2. l'infezione da MT per via aerea modifica il microbiota intestinale;
3. gli anaerobi presenti nel polmone e provenienti dal cavo orale per aspirazione producono metaboliti che riducono l'immunità polmonare;
4. l'aumentata suscettibilità alla reinfezione da MT è probabilmente dovuta alla deplezione degli epitopi antigenici per le cellule T nella flora intestinale commensale (micobatteri non tubercolari);
5. il trattamento antibiotico prolungato necessario per la cura della TBC ha effetti dannosi a lungo termine sul microbiota.



**Fig. 3:** Ruolo del microbiota polmonare nella patogenesi della Tuberculosis.

*Role of the lung microbiota in the pathogenesis of Tuberculosis.*

## EFFETTI DELLA TERAPIA SUL MICROBIOTA

Numerosi studi hanno evidenziato che la somministrazione di antibiotici sia responsabile di alterazioni a carico del microbiota sia intestinale che polmonare. Gli effetti sul microbiota intestinale sono ben documentati mentre i dati relativi alla disbiosi polmonare sono scarsi. Gli effetti dei farmaci sul microbiota si manifestano sia durante la terapia (effetti acuti) che dopo la sua sospensione (effetti cronici) (11). La terapia con HRZE (isoniazide, rifampicina, pirazinamide, etambutolo) ha minimi effetti sulla diversità dei phyla del microbiota intestinale, ma determina alterazioni evidenti sulla loro distribuzione e quantità. Gli studi mostrano un aumento del genere dei phyla *Bacteroides* e *Proteobacteria* ed una significativa riduzione del phylum *Firmicutes* (*Clostridiales*).

Gli effetti cronici della terapia consistono nella persistenza della disbiosi a distanza di 1-3 anni dalla sospensione della stessa. Markers della disbiosi persistente sono la riduzione dei Bacteroides, dei Firmicutes (Clostridiales, Ruminococcus, Faecalibacterium) ed un aumento degli Actinobacteria e Proteobacteria (Escherichia, Salmonella, Yersinia, Helicobacter). Si è ipotizzato che la disbiosi acuta e cronica in corso di terapia possa essere responsabile di tre possibili condizioni: 1) alterazione della risposta immunitaria dell'ospite che può influenzare il decorso e la severità della malattia; 2) modificazione della risposta terapeutica; 3) aumentato rischio di reinfezione (12).

#### Alterazione della risposta immunitaria

La disbiosi riduce la risposta immunitaria nei confronti del MT e determina un aumento dell'infiammazione in corso di malattia. Responsabili di queste alterazioni sono la riduzione dei Bacteroides e dei Firmicutes, in particolare del Ruminococcus e del Coprococcus che regolano l'espressione della IL-1 e del IFN- $\gamma$  e del Bifidobacterium che riduce l'attività dei Th17 (13).

#### Modificazioni della risposta terapeutica

Non sono presenti in letteratura significative evidenze che confermino l'importanza della disbiosi sulla efficacia dei farmaci, seppure si ipotizzi che le alterazioni a carico della mucosa intestinale e della sua funzione di barriera possano essere responsabili di un ridotto assorbimento e metabolismo dei farmaci (14).

#### Aumentato rischio di reinfezione

La persistenza della disbiosi a distanza di anni dalla sospensione della terapia sembra essere responsabile di un aumento del rischio di reinfezione. La minore resistenza dell'ospite nei confronti del MT è correlata ad un profilo individuale del microbiota, precedente la malattia o modificato dalla terapia, che intereagisce con specifici epitopi del patogeno (15).

### CONCLUSIONI

Al momento attuale si ritiene che esista una interrelazione tra il microbiota, la malattia tubercolare e la terapia. L'infezione da MT è legata ad una risposta immunologica peculiare e complessa, che è microbiota-dipendente. Le modificazioni, prevalentemente a carico del microbiota intestinale, sono responsabili di una minore resistenza del soggetto nei confronti del MT, che può essere causa della ripresa della moltiplicazione dei micobatteri e della disseminazione extra-polmonare dell'infezione.

### BIBLIOGRAFIA

- (1) World Health Organization. *Global tuberculosis report 2021*. Available online: Global tuberculosis report. 2021 (who.int). Accessed on 24/10/2021.
- (2) Dickson RP., et al. *The microbiome and the respiratory tract*. Annu Rev Physiol. 2016; 78: 481–504.
- (3) Zheng D., et al. *Interaction between microbiota and immunity in health and disease*. Cell Res. 2020; 30: 492-506.
- (4) Ramanan D., et al. *Bacterial Sensor Nod2 Prevents Inflammation of the Small Intestine by Restricting the Expansion of the Commensal Bacteroides vulgatus*. Immunity. 2014;41: 311-324.
- (5) Erturk-Hasdemir D., et al. *Symbionts exploit complex signaling to educate the immune system*. Proc Natl Acad Sci. 2019; 116: 26157-26166.
- (6) Gury-BenAri M., et al. *The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome*. Cell. 2016; 166: 1231-1246.e13.
- (7) Omenetti S., et al. *The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells*. Immunity. 2019; 51: 77-89.e6.

- (8) Bachem A., et al. *Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8+ T Cells*. *Immunity*. 2019; 51: 285-297.e5.
- (9) Naidoo CC., et al. *The microbiome and tuberculosis: state of the art, potential applications, and defining the clinical research agenda*. *Lancet Respir Med*. 2019; 7: 892-906.
- (10) Namasivayam S., et al. *The microbiome and tuberculosis: early evidence for cross talk*. *mBio*. 2018; 9: e01420-18.
- (11) Wipperman MF., et al. *Antibiotic treatment for Tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed*. *Sci Rep*. 2017; 7: 10767.
- (12) Khan N., et al. *Alteration in the Gut Microbiota Provokes Susceptibility to Tuberculosis*. *Front Immunol*. 2016; 7: 529.
- (13) Arpaia N., et al. *Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation*. *Nature*. 2013; 504: 451-455.
- (14) Yang JH., et al. *Antibiotic-Induced Changes to the Host Metabolic Environment Inhibit Drug Efficacy and Alter Immune Function*. *Cell Host Microbe*. 2017; 22: 757-765.e3.
- (15) Verver S., et al. *Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171: 1430-14.