

Il catrame del fumo di tabacco come fattore di crescita e di virulenza del *Mycobacterium tuberculosis*

Vincenzo Zagà, Maria Sofia Cattaruzza

Il *Mycobacterium tuberculosis* (MT) e il fumo di tabacco rappresentano, in un certo senso, rispettivamente, il passato e il presente (ma purtroppo anche il futuro), quali responsabili delle maggiori epidemie di malattia e di morte per patologie respiratorie. In realtà, le cose non sono così semplici e le due tematiche hanno a tutt'oggi rilevanti aspetti in comune.

Nonostante gli importanti progressi nel controllo di questa patologia, la tubercolosi (TB) conti-

nua a essere una minaccia globale. Secondo i dati dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [1], questa rappresenta una delle prime 10 cause di morte in tutto il mondo. Nel 2017, 10 milioni di persone si sono ammalate di tubercolosi e 1,6 milioni sono morte a causa della malattia (tra cui 0,3 milioni di persone con HIV). Sempre nello stesso anno, circa 1 milione di bambini si sono ammalati di tubercolosi con una mortalità di 230.000 (compresi i bambini affetti

da tubercolosi associata all'HIV). La TBC multiresistente (MDR-TB) rappresenta un problema montante di salute pubblica e una minaccia per la sicurezza sanitaria mondiale [1].

Tra i fattori più strettamente correlabili alle epidemie di tubercolosi negli ultimi 30 anni vanno ricordati la diffusione dell'infezione da HIV, da un lato, e l'emergenza della multi-farmaco-resistenza dall'altro [2]. Tuttavia, tra i molti altri fattori implicati, anche il fumo di tabacco

The tobacco smoke tar as a growth and virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*

Vincenzo Zagà, Maria Sofia Cattaruzza

The *Mycobacterium tuberculosis* (MT) and tobacco smoke represent, in a certain way, respectively, the past and the present (but unfortunately also the future), which are responsible for the major epidemics of disease and death due to respiratory diseases. In reality, things are not so simple and the two topics still have important features in common.

Despite significant advances in the control of this disease, tuberculosis (TB) continues to be a global threat,

and according to World Health Organization (WHO) data [1], it is one of the ten major causes of death worldwide. In 2017, 10 million people contracted tuberculosis and 1.6 million died from this disease (including 0.3 million people with HIV/AIDS). In the same year, about 1 million children were affected by tuberculosis with a mortality of 230,000 (including children with HIV-associated tuberculosis). Multi-drug-resistant TB (MDR-TB) represents a rising public health

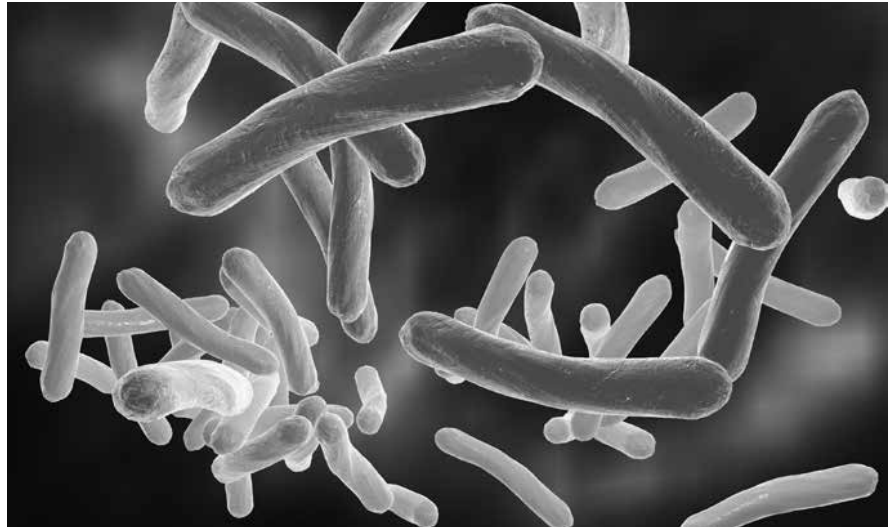
problem and a threat to global health security [1].

Among the factors most closely correlated to the tuberculosis epidemics in the last 30 years, we must mention, on the one hand the spreading HIV infection, and on the other, the emergence of multi-drug-resistance [2]. However, among many other factors involved, tobacco smoking, known for a long time, but probably underestimated, also plays an important role.

gioca un ruolo importante, noto da tempo, ma, verosimilmente, sotto-stimato.

Da valutazioni condotte già alcuni anni orsono, attraverso revisioni sistematiche e metanalisi di numerosi studi sull'associazione tra fumo e tubercolosi, nonché dalla review di Perriot e coll. pubblicata in questo numero di Tabaccologia, emerge un'evidenza forte nel rapporto tra TB e fumo di tabacco, sia che venga considerata l'infezione, la malattia o la mortalità.

Aspetto di particolare importanza è la presenza nei fumatori di un più lungo periodo di contagiosità, con prolungato rischio di trasmissione dei micobatteri. Ciò conferma l'importanza di considerare con maggiore attenzione il rapporto fra fumo e tubercolosi. In particolare, si sottolinea in questo contributo, come ancora oggi siano pochi gli studi sull'impatto della cessazione del fumo sull'esito della malattia. Dai vari studi epidemiologici, fra



cui quelli di Leung e coll. [3], e di Vanden Driessche e coll. [4], emerge che la quota di tubercolosi ascrivibile al fumo si potrebbe stimare dal 13 al 20%, con ampie variazioni tra regioni in rapporto all'incidenza del fumo e della farmacoresistenza del MT, nella popolazione esaminata.

Un'emergenza mondiale questa da TB come quella da fumo di tabacco, con 1,1 miliardi di fumatori e una ecatombe di circa 7 milioni di morti per patologie fumo-correlate/anno.

Un connubio tra *Mycobacterium tuberculosis* e fumo di tabacco molto pericoloso. È ormai evidenza co-

From assessments conducted a few years ago through systematic reviews, meta-analyses of many studies on the association between smoking and tuberculosis and the review by Perriot et al. published in this issue of Tobacco, a strong evidence in the correlation between TB and tobacco smoke emerges, whether infection, illness or mortality is considered. Of particular importance is the presence among smokers of a longer period of infectiousness, with a prolonged risk of transmission of mycobacteria. This confirms the importance of considering more carefully the relationship between smoking and tuberculosis. In particular, it is emphasized in this contribution, that even today there are too few studies on the impact of smoking cessation and the outcome of the disease.

Data from various epidemiological studies, including those by Leung et al. [3], and by Vanden Driessche et al. [4], point out that the pro-

portion of tuberculosis attributable to smoking may be estimated from 13% to 20%, with large variations between regions in relation to the incidence of smoking and the drug resistance of Koch Bacillus (BK), in the population examined.

TB, like tobacco epidemic, is a worldwide emergency with 1.1 billion smokers and about 7 million deaths from smoking-related illnesses every year.

The combination of *Mycobacterium tuberculosis* and tobacco smoke is very dangerous. There is now common evidence, supported by clinical and epidemiological data, that smokers become more infected, get more ill and die more from tuberculosis [5]. This correlation exists, albeit weaker, also for passive smoking [6].

On the other hand, the suspicion of this dangerous smoking/tuberculosis association is not recent at all, if, already in 1956, it induced the British Medical Journal (BMJ)

to publish an article by Lowe on the subject [7].

About the possible etiopathogenetic mechanisms, much of the research has focused, as always, almost exclusively on the decline in immune defences, which smoke attacks all-round with the heavy pounding of the oxidative stress and the other hundreds of thousands of irritating and carcinogenic substances that the body suffers from each puff [8].

But today the true, although obvious, question that every good clinician and researcher should ask himself in front of epidemiological data of this magnitude [9] is: why do smokers become infected, sick and die more often from tuberculosis? Why does this happen?

Already in 1967 Green and Carolin had hypothesized and demonstrated how tobacco smoke inhibits the antibacterial activity of macrophages which, together with the reduction of mucociliary clearance, enhances the implantation of bacte-

mune, infatti, peraltro supportata da dati clinici ed epidemiologici, che i fumatori si infettano di più, si ammalano di più e muoiono di più di tubercolosi [5]. Tale correlazione esiste, pur se più debole, anche per il fumo passivo [6].

D'altra parte il sospetto di questa pericolosa associazione fumo/tubercolosi non deve essere recente se già nel 1956 indusse il British Medical Journal (BMJ) a pubblicare un articolo di Lowe sull'argomento [7].

Riguardo ai possibili meccanismi eziopatogenetici, però, gran parte della ricerca si è focalizzata, da sempre, quasi esclusivamente sul calo delle difese immunitarie, che il fumo compromette a tutto campo con il pesante martellamento dello stress ossidativo e delle altre centinaia di migliaia di sostanze irritanti e cancerogene che l'organismo subisce a ogni boccata [8].

Ma oggi la vera, seppur ovvia, domanda che ogni buon clinico e ricercatore dovrebbe porsi davanti a dati epidemiologici di questa

portata [9] è: perché i fumatori si infettano di più, si ammalano di più e muoiono di più di tubercolosi? Perché succede questo?

Già nel 1967 Green e Carolin avevano ipotizzato e dimostrato come il fumo di tabacco inibisce l'attività antibatterica dei macrofagi che, unitamente alla riduzione della clearance mucociliare, favorisce l'impianto di batteri e virus nell'apparato broncopolmonare [10].

Negli anni successivi, gran parte dei ricercatori si sono concentrati quasi esclusivamente sullo studio delle difese fiaccate dal fumo senza valutare se il fumo di tabacco potesse agire, e in che modo, anche sull'agente "aggressore", che nel nostro caso è il *Mycobacterium tuberculosis*. Si è dimenticato che in un'efficace strategia militare non si può prescindere dal valutare la forza dell'aggressore, da tutto ciò che può sostenerlo e dargli più capacità di penetrazione nelle linee difensive avversarie. Lo studio dell'avversario, da sempre, è asso-

lutamente strategico per qualsiasi tattica vincente.

Nel 1983, sul *Journal of the Royal Society of Medicine*, fu pubblicata una lettera di Kotian che per primo ipotizzava, con i suoi studi, che il fumo poteva essere un elemento di crescita per i MT [11]. Questa notizia non suscitò interesse scientifico fino al 2007, quando su *Tabaccologia* fu pubblicato l'articolo originale di Shprykov e coll. [12], della *State Medical Academy* di Nizhny Novgorod (Federazione Russa), in cui, per la prima volta in letteratura, si cercò di dimostrare cosa succede nel bacillo tubercolare sotto l'effetto del fumo di tabacco.

Da questo studio si evidenzia come il condensato del fumo di tabacco (CFT) determini nelle colonie esposte rispetto a quelle di controllo:

- crescita batterica accelerata di 7-8 giorni (**Figura 1**);
- aumento di due volte della massa batterica (**Figura 2**);
- moderato aumento dell'attività enzimatica;

ria and viruses in the broncho-pulmonary apparatus [10].

In the following years, most of the researchers focused their work almost exclusively on the study of the smoke-weakened defences without assessing whether, and in which way, tobacco smoke could also activate the "aggressor agent" that in our case is *Mycobacterium tuberculosis*. They forgot that in an effective military strategy one cannot ignore evaluating the strength of the aggressor and of everything that can support him and give him more force of penetration into the opposing defensive lines. Studying the foe has always been absolutely crucial for any winning tactic.

In 1983, a letter by Kotian was published in the *Journal of the Royal Society of Medicine* in which he first hypothesized, according with his studies, that smoking could be an element of growth for MT [11]. This news did not arouse scientific interest until 2007, when in *Tabaccologia* the original article by

Shprykov and collaborators [12], from the *State Medical Academy* of Nizhny Novgorod (Russia), was published. In this article, for the first time in literature, an attempt was made to demonstrate what happens in the tuberculosis bacillus under the influence of tobacco smoke.

This study shows what the tobacco smoke condensate (CFT) determined in exposed colonies compared to the control ones; in particular it:

- accelerated bacterial growth of 7-8 days (**Figure 1**);
- increased by two fold bacterial mass (**Figure 2**);
- moderately increased enzyme activity;
- determined quantitative changes of some fatty acids (peak increase of mycolic acid with 25, 24 and 14 carbon atoms, as shown by gas chromatography);
- thickened the lipid capsule;
- increased the number of polysomes and semi-phosphatic granules that suggest the activa-

tion of biochemical processes in the exposed mycobacteria.

All this suggests a stimulating effect of smoking tar on the growth and biological activities of MT, leading to greater virulence and probably favouring the selection of drug-resistant strains [13].

This increased aggressiveness of MT in smokers is the result of the combination of a reduction in immune defences and a more pronounced virulence due to some growth factor present in the CFT. It also supports the epidemiological data of greater infection capacity, morbidity and mortality and also contributes to explain the laboratory evidence of the delayed testing negativity of smokers affected by tuberculosis with all the possible consequences [14].

Undoubtedly, this article, which reports the role played by tobacco smoke, in detail by its condensate, on the growth of mycobacteria in general and more particularly

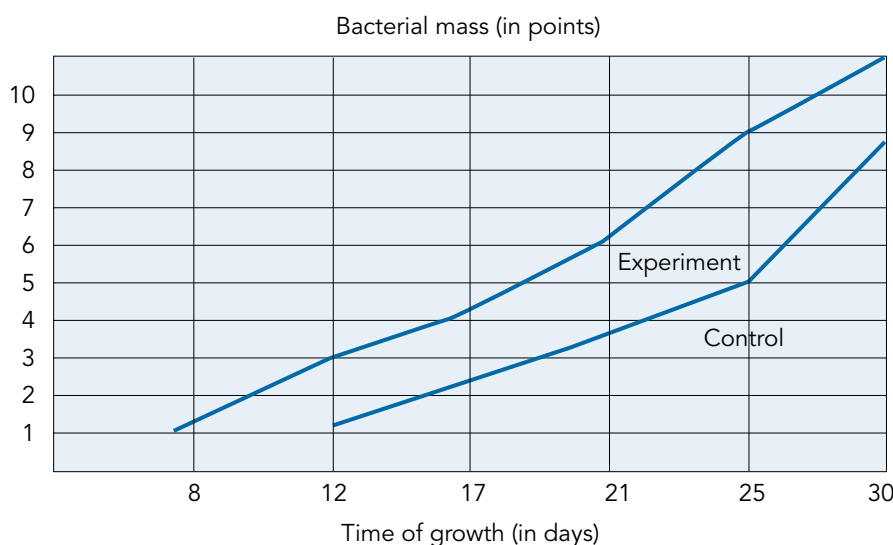


Figura 1 Dinamica della crescita dell'MTB strain n. 4688 nel terreno di coltura con una diluizione di 4 volte di condensato di fumo di tabacco.

Growth dynamics of MTB strain n. 4688 in the culture medium with a 4-fold dilution of tobacco smoke condensate.

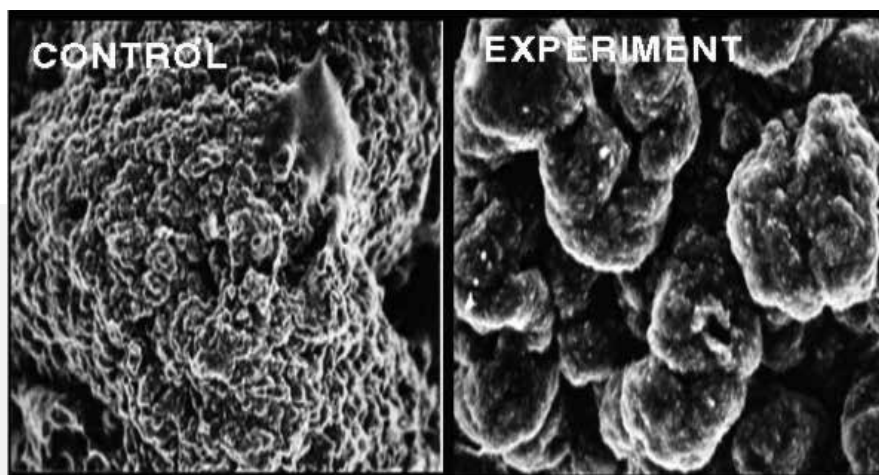


Figura 2 Microfotografie delle colonie di controllo di MTB strain n. 4688 (a sinistra) e delle colonie coltivate con una diluizione di 3 volte di condensato di fumo di tabacco (a destra) (ingrandimento 2500 volte).

Photomicrographs of the control colonies of MTB strain n. 4688 (left) and cultivated colonies with a 3-fold dilution of tobacco smoke condensate (right) (magnified 2500 times).

of the colonies on Löwenstein-Jensen terrain, presents elements of current interest and curiosity [14-16].

For example, the fact that the stimulus to the growth of mycobacteria occurs with a wide variability of condensate dilutions suggests a much more incisive role for tobacco than previously thought. In other words, this should lead to think of getting out the idea of a simple

adjuvant action of tobacco smoke that can be performed on an immunological level through the depression of the macrophage and lymphocyte components, and/or on a mechanical level, through the altered function of mucociliary clearance which could contribute to spread bacilli to various broncho-pulmonary territories. Instead, there may be a veritable stimulus due to one or more "growth fac-

- variazioni quantitative di alcuni acidi grassi (aumento di picco dell'acido micolico con 25, 24 e 14 atomi di carbonio, come evidenziato con la gascromatografia);
- ispessimento della capsula lipidica;
- aumento del numero di polisomi e di granuli semimetafosfatici che suggeriscono l'attivazione di processi biochimici nei Micobatteri esposti.

Tutto ciò suggerisce un effetto stimolante del catrame sulla crescita e sulle attività biologiche del MT, determinandone una maggiore virulenza e verosimilmente favorendone la selezione di ceppi farmaco-resistenti [13].

Questa maggiore aggressività del MT nei pazienti fumatori, frutto quindi della combinazione incrociata di una riduzione delle difese immunitarie e di una più spiccata virulenza dovuta a un qualche fattore di crescita presente nel CFT, oltre a giustificare i dati epidemiologici

tors" not yet identified but likely present among the over 7,000 substances present in the combustion product [17].

On the clinical side, these new scientific acquisitions could be useful to clinicians, primarily pneumologists, to become aware of the problem of this dangerous smoking/tuberculosis association and thus transpose it to patients for motivational purposes in a smoking cessation process. Therefore, also tuberculosis should be included among the many diseases for which smoking cessation allows a greater efficacy of pharmacotherapy. In conclusion, we hope that in the future, this study can be replicated and deepened by resorting to the most current molecular biology methods in order to better grasp the characteristic moments of the most intimate process that can give an account of what has already been observed.

di maggiore infeziosità, morbilità e mortalità, contribuisce a spiegare anche il rilievo laboratoristico della più tardiva negativizzazione dei pazienti fumatori affetti da tubercolosi con tutte le possibili conseguenze del caso [14].

Indubbiamente, questo articolo, nel quale viene riportato il ruolo esercitato dal fumo di tabacco, o meglio dal suo condensato, sulla crescita dei micobatteri in generale e più in particolare delle colonie su terreno di Löwenstein-Jensen, presenta elementi di attualità e di curiosità [14-16].

Per esempio, il fatto che lo stimolo alla crescita dei micobatteri avvenga con un'ampia variabilità di diluizioni del condensato fa pensare a un ruolo del tabacco molto più incisivo rispetto a quanto si potesse supporre in passato. In altre parole, ciò dovrebbe portare a pensare di uscire dall'idea di semplice azione adiuvante del fumo di tabacco che si possa esplicare su un piano im-

munologico attraverso la depressione delle componenti macrofagica e linfocitaria, e/o su un piano meccanico, attraverso l'alterata funzione della clearance mucociliare la quale potrebbe contribuire a diffondere i bacilli a vari territori broncopulmonari. Si assisterebbe, invece, a un vero e proprio stimolo dovuto a uno o più "fattori di crescita" non ancora individuati ma certamente presenti tra le oltre 7.000 sostanze presenti nel prodotto di combustione [17].

Sul versante clinico queste nuove acquisizioni scientifiche dovrebbero servire ai medici, pneumologi *in primis*, a prendere coscienza del problema di questa pericolosa associazione fumo/tubercolosi per poi trasferirla ai pazienti a scopo motivazionale in un percorso di *smoking cessation*. Pertanto, anche la tubercolosi va a buon diritto inclusa tra le molte patologie per le quali la cessazione del fumo consente una maggiore efficacia della far-

macoterapia, nello specifico anti-tubercolare.

In conclusione, ci si augura che in futuro lo studio possa essere replicato e approfondito, ricorrendo ai più attuali metodi di biologia molecolare, in modo da poter meglio cogliere i momenti caratterizzanti il processo più intimo e dando conto di quanto già osservato.

[Tabaccologia 2019; 2:9-13]

Vincenzo Zagà

Presidente Società Italiana di Tabaccologia (SITAB),
Medico Pneumologo, Giornalista
Medico Scientifico, Bologna

Maria Sofia Cattaruzza

Vice Presidente Società Italiana di Tabaccologia (SITAB),
Dipartimento di Sanità Pubblica e
Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma

► *Disclosure: gli autori dichiarano l'assenza di conflitto d'interessi.*

Bibliografia

- World Health Organization (WHO). Tuberculosis. 18 September 2018. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- Sotgiu G, Mauch V, Migliori GB, Benedetti A. Evidence-based, agreed-upon health priorities to remedy the tuberculosis patient's economic disaster. *Eur Respir J* 2014;43:1563-6.
- Leung CC, Yew WW, Chan CK, Chang KC, Law WS, Lee SN, et al. Smoking adversely affects treatment response, outcome and relapse in tuberculosis. *Eur Respir J* 2015;45:738-45.
- Vanden Driessche K, Patel MR, Mbonze N, Tabala M, Yotebieng M, Behets F, et al. Effect of smoking history on outcome of patients diagnosed with TB and HIV. *Eur Respir J* 2015;45:839-42.
- Gajalakshmi V, Peto R, Kanaka TS, Jha P. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43,000 adult male deaths and 35,000 controls. *Lancet* 2003; 362:507-15.
- Lin HH, Ezzati M, Murray M. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2007;4:e20.
- Lowe CR. An association between smoking and respiratory tuberculosis. *Br Med J* 1956;12:1081-6.
- Zagà V. Tubercolosi & Fumo di Tabacco: problema immunitario ma non solo. *Annali degli Ospedali San Camillo e Forlanini* 2010;12:197-8.
- National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health. The health consequences of smoking-50 years of progress. A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US) 2014.
- Green GM, Carolin D. The depressant effect of cigarette smoke on the in vitro antibacterial activity of alveolar macrophages. *N Engl J Med* 1967;276:421-7.
- Kotian M, Shivananda PG, Rao KN. Modified medium for the rapid growth of Mycobacterium tuberculosis. *J R Soc Med* 1983;76:530-1.
- Shprykov AS, Shkarin VV, Shpryкова ON. Fumo di tabacco e crescita del Mycobacterium tuberculosis/Tobacco smoking and the Mycobacterium tuberculosis's growth. *Tabaccologia* 2007;4:22-6.
- Shprykov AS. Drug resistance in Mycobacterium Tuberculosis during chronic intoxication by tobacco: clinical and experimental studies. *Probl Tuberk Bolezn Legk* 2009; 8:34-7.
- Gullón JA, Suárez I, Lecuona M, Fernández R, Rubinos G, Medina A, et al. Time to culture conversion in smokers with pulmonary tuberculosis. *Monaldi Arch Chest Dis* 2009;71: 127-31.
- Abal AT, Jayakrishnan B, Parwer S, El Shamy A, Abahusain E, Sharma PN. Effect of cigarette smoking on sputum smear conversion in adult with active pulmonary tuberculosis. *Respir Med* 2005;99:415-20.
- Cailleaux-Cezar M, Loredó C, Silva JRLE, Conde MB. Impact of smoking on sputum culture conversion and pulmonary tuberculosis treatment outcomes in Brazil: a retrospective cohort study. *J Bras Pneumol* 2018;44:99-105.
- Food and Drug Administration. Tobacco products. www.fda.gov/Tobaccoproduct/