

# Premi SIMRI 2016 ed Abstract dal Congresso SIMRI

---



# Epidemiologia delle infezioni batteriche in una popolazione di soggetti con discinesia ciliare primaria

*Epidemiology of bacterial infections in a population of subjects with primary ciliary dyskinesia*

Martina Piras, Maria Elisa Di Cicco, Michele Rizzo, Nina Tyutyusheva, Teresa Di Chio, Maria Grazia Esposito, Iacopo Vellere, Elisabetta Bellino, Giovanni Federico, Diego Peroni, Massimo Pifferi  
**Sezione di Pneumologia ed Allergologia – Unità Operativa di Pediatria 1 – Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana**

Corrispondenza: Martina Piras email: martinaprs@gmail.com

**Riassunto:** La discinesia ciliare primaria (DCP) è una malattia rara, geneticamente eterogenea, caratterizzata da una compromissione della clearance mucociliare e da infezioni respiratorie ricorrenti/recidivanti o croniche. Pochi studi, tuttavia, hanno valutato l'epidemiologia delle infezioni respiratorie nella DCP. Abbiamo eseguito l'esame colturale dell'espettorato in 126 pazienti (72 bambini) con DCP e in 139 soggetti (104 bambini) con infezioni respiratorie ricorrenti non affetti da DCP. Nei soggetti con DCP sono stati isolati *Pseudomonas aeruginosa* (33.3% dei casi), *Staphylococcus aureus* (17.3%), *Haemophilus influenzae* (8.7%), *Stenotrophomonas maltophilia* (4.0%) e *Streptococcus pneumoniae* (4.0%), mentre nel 32.5% dei casi l'esame colturale era negativo. Nei soggetti non affetti sono stati isolati *P. aeruginosa* (7.9%), *S. aureus* (16.5%), *H. influenzae* (6.5%), *S. maltophilia* (2.2%) e *S. pneumoniae* (1.4%), mentre nel 65.5% dei casi l'esame colturale era negativo. Confrontando le due popolazioni, sia complessivamente sia separando i bambini dagli adulti, emergeva soltanto una maggior prevalenza di *P. aeruginosa* nella DCP ( $p < 0.001$  in entrambi i gruppi di età). In 85 soggetti con DCP seguiti longitudinalmente sono stati raccolti 592 campioni di espettorato in 3.5 anni. Vi era una correlazione positiva tra età e *P. aeruginosa* ( $r = 0.88, p < 0.01$ ) e negativa tra età e *S. aureus* ( $r = -0.43, p < 0.01$ ).

I nostri risultati confermano l'importanza delle infezioni nella DCP, con elevata prevalenza di *P. aeruginosa* ad ogni età, e mostrano come queste siano sostenute soprattutto da *S. aureus* nelle prime epoche della vita e da *P. aeruginosa* successivamente.

**Parole chiave:** Epidemiologia, infezioni batteriche, *Pseudomonas aeruginosa*, discinesia ciliare primaria.

**Summary:** Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare, genetically heterogeneous disease, characterized by impaired mucociliary clearance and recurring/relapsing or chronic respiratory infections. Few studies, however, have assessed the epidemiology of respiratory infections in PCD. We collected sputum culture from 126 patients (72 children) with PCD and 139 non-PCD subjects (104 children) with recurrent respiratory infections. Pathogens isolated in PCD subjects were *Pseudomonas aeruginosa* (33.3% of the cases), *Staphylococcus aureus* (17.3%), *Haemophilus influenzae* (8.7%), *Stenotrophomonas maltophilia* (4.0%), and *Streptococcus pneumoniae* (4.0%), while sputum culture was negative in 32.5% of the cases. In non-PCD subjects *P. aeruginosa* (7.9%), *S. aureus* (16.5%), *H. influenzae* (6.5%), *S. maltophilia* (2.2%), and *S. pneumoniae* (1.4%) were isolated, while sputum culture was negative in 65.5% of the cases. *P. aeruginosa* had significantly higher prevalence in the PCD group both in the whole population and after separating children from adults ( $p < 0.001$  in each group of age). In 85 PCD patients followed longitudinally 592 sputum samples were collected over 3.5 years, and a positive correlation was observed between age and *P. aeruginosa* ( $r = 0.88, p < 0.01$ ), while there was a negative relationship between age and *S. aureus* ( $r = -0.43, p < 0.01$ ).

Our results confirm the importance of infections in PCD, with high prevalence of *P. aeruginosa* at any age, and show that they are caused mainly by *S. aureus* in early stages of life and by *P. aeruginosa* afterwards.

**Key words:** Epidemiology, bacterial infections, *Pseudomonas aeruginosa*, primary ciliary dyskinesia.

## INTRODUZIONE

La discinesia ciliare primaria (DCP) (OMIM #244400) è una malattia rara, geneticamente eterogenea, caratterizzata dalla presenza di infezioni ricorrenti/recidivanti o croniche delle vie aeree superiori ed inferiori. Alla base di questa condizione sono anomalie dell'ultrastruttura e/o della funzione delle ciglia respiratorie, che portano alla compromissione della *clearance* muco-ciliare (1). Uno studio osservazionale delle infezioni respiratorie in questi soggetti ha documentato che *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e specie appartenenti alla flora orofaringea sono i germi più frequentemente isolati in bambini ed adolescenti, mentre *Pseudomonas aeruginosa* e micobatteri non-tubercolari lo sono più comunemente negli adulti e in pazienti con malattia polmonare avanzata (2).

In un recente studio longitudinale è stato dimostrato come, nei pazienti con DCP, la progressione della malattia polmonare possa risultare anche da un cambiamento dei patogeni delle basse vie aeree nel tempo (3). Secondo questo studio, infatti, ad un iniziale predominio in età pediatrica di *H. influenzae* e *Moraxella catarrhalis* fa seguito l'infezione da parte di *P. aeruginosa*, più comune in adolescenti e adulti. Abbiamo, pertanto, verificato anche nella nostra casistica di pazienti con DCP la prevalenza delle varie specie microbiche isolate rispetto a pazienti con elevata morbilità respiratoria in cui la diagnosi di DCP veniva esclusa e la relazione delle stesse specie microbiche con l'età dei pazienti con DCP studiati longitudinalmente per circa 3.5 anni.

## MATERIALI E METODI

In 126 pazienti con DCP [72 bambini; 62 maschi; età media, 15.2 anni (IQR, 24.6)] ed in 139 soggetti con elevata morbilità respiratoria di tipo infettivo ma nei quali tale diagnosi era stata esclusa [104 bambini; 78 maschi; età media, 9,4 anni (IQR, 13,3)] sono stati ottenuti, al mattino e a digiuno, 3 campioni di espettorato (se collaboranti) o di aspirato ipofaringeo (se non collaboranti) per l'isolamento e l'identificazione di eventuali patogeni. Ottantacinque dei 126 pazienti con DCP sono stati monitorati periodicamente, ripetendo le stesse valutazioni microbiologiche (592 campioni totali). Sono stati utilizzati i criteri di Leeds per valutare la cronicità dell'infezione da *P. aeruginosa* (rilevamento del germe in  $\geq 50\%$  delle colture/anno per due anni consecutivi, con almeno tre colture positive), mentre l'infezione era considerata intermittente se vi era isolamento di *P. aeruginosa* in  $< 50\%$  delle colture nell'anno precedente, con almeno una coltura positiva in passato (4).

Il confronto di prevalenze dei microrganismi isolati è stato eseguito con il test di Fisher a due code. La correlazione tra isolamento di un determinato microrganismo ed età è stata calcolata con il test di Spearman. È stato utilizzato il software SPSS Statistics Versione 19.0.

La significatività statistica è stata stabilita come valore di  $p < 0,05$ .

In tutti i pazienti di età  $> 18$  anni o nei loro genitori, se di età  $< 18$  anni, era ottenuto il consenso informato e lo studio era approvato dal locale comitato etico.

## RISULTATI

Le specie batteriche più frequentemente isolate nei pazienti con DCP sono state *P. aeruginosa* (33.3% dei casi), *S. aureus* (17.3%), *H. influenzae* (8.7%), *Stenotrophomonas maltophilia* (4.0%) e *S. pneumoniae* (4.0%), mentre il 32.5% dei soggetti presentava un esame colturale negativo.

Nel gruppo di soggetti non affetti da DCP sono stati isolati *P. aeruginosa* (7.9% dei casi), *S. aureus* (16.5%), *H. influenzae* (6.5%), *S. maltophilia* (2.2%) e *S. pneumoniae* (1.4%), mentre nel 65.5% dei casi l'esame colturale era negativo. Dal confronto fra le due popolazioni emergeva una differenza statisticamente significativa solo per la prevalenza di isolamento di *P. aeruginosa* ( $p < 0.0001$ ).

Confrontando le due popolazioni, si è osservata una prevalenza significativamente più elevata di infezioni sostenute da *P. aeruginosa* sia nei bambini con DCP (15/72 soggetti) rispetto ai coetanei non affetti (5/104 soggetti), sia negli adulti con tale patologia (27/54 soggetti) rispetto ai non affetti (6/35 soggetti) con  $p < 0.001$  in entrambi i gruppi di età.

Degli 85 pazienti con DCP seguiti in media per  $3.5 \pm 2.1$  anni, 18 (21.2%; 10 bambini) presentavano esame colturale persistentemente negativo e 35 (41.2%; 13 bambini) persistentemente positivo. Infine, 10 pazienti (11.8%; 1 bambino) avevano un'infezione cronica da *P. aeruginosa*, mentre 5 (5.8%; 2 bambini) presentavano un'infezione intermittente.

Infine, nei soggetti con DCP la prevalenza di *P. aeruginosa* e *S. aureus* presentava una correlazione rispettivamente positiva ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.01$ ) e negativa ( $r = -0.43$ ,  $p < 0.01$ ) con l'età.

## DISCUSSIONE

La maggiore prevalenza delle infezioni batteriche nei soggetti affetti da DCP è probabilmente la diretta conseguenza del deficit di *clearance* muco-ciliare.

È stato infatti dimostrato che nella DCP la rimozione delle particelle ispirate avviene con un ritardo di circa una settimana rispetto ai soggetti sani (5).

Si può ritenere, dunque, che eventuali batteri inalati permangano più a lungo a contatto con l'epitelio respiratorio, esercitando su di esso un'azione lesiva protratta.

La ridotta *clearance* muco-ciliare, quindi, insieme alla fisiologica immaturità del sistema immunitario nell'età pediatrica potrebbe indurre una maggiore suscettibilità alle infezioni batteriche in epoca precoce, creando anche le basi per successive infezioni da parte di altri microrganismi.

Tra gli elementi da considerare in questo senso è la formazione di biofilm, che facilita la colonizzazione cronica creando una nicchia nella quale i batteri sono più resistenti alle difese dell'ospite e agli antimicrobici.

Nel caso di *P. aeruginosa*, la persistenza è favorita anche dalle sue caratteristiche di virulenza, che conferiscono al germe la capacità di eludere i meccanismi di difesa dell'ospite, e dalla sua capacità di adattarsi rapidamente ad un nuovo ambiente (6).

Infatti, nelle prime fasi dell'infezione polmonare, appaiono di estrema importanza sia i fattori cellulari, sia quelli secreti dal batterio.

In particolare, la presenza di flagelli e pili, oltre a conferire motilità, favorisce l'adesione del microorganismo all'epitelio respiratorio, specialmente alla mucina che lo ricopre.

Questo processo nella DCP potrebbe essere favorito dall'assenza della *clearance* muco-ciliare. Tra i fattori secreti, sono di particolare importanza l'elastasi, la fosfatasi alcalina, l'esotossina A e la fosfolipasi C, che una volta liberati nello spazio extracellulare esercitano un'azione citotossica, determinando la distruzione del glicocalice dell'epitelio respiratorio con esposizione di ligandi epiteliali utili all'adesione del germe alla mucosa (7).

Alla citotossicità contribuiscono inoltre tossine (quali ExoS, ExoT, ExoU ed ExoY) che, iniettate direttamente dal germe nel citosol delle cellule, ne favoriscono l'invasione e la diffusione nei tessuti (8). Una volta stabilita l'infezione nelle vie aeree, occorre verificare la transizione di *P. aeruginosa* ad uno stato di persistenza con *down-regulation* della maggior parte delle sue funzioni invasive, soprattutto quella di pili e flagelli che potrebbero essere riconosciuti dal sistema immunitario, mentre è favorita la produzione del biofilm (9).

Questo fenomeno è ulteriormente rafforzato a seguito delle interazioni tra le specie batteriche. In letteratura sono state descritte varianti a piccola colonia di *S. aureus*, comunemente associate alla persistenza del batterio e alla co-infezione con altri patogeni, in particolare *P. aeruginosa* (10). Sembra, quindi, che *S. aureus* e *P. aeruginosa* interagiscano sinergicamente.

L'infezione iniziale da parte di *S. aureus* potrebbe, quindi, rappresentare l'innescò che attiva o amplifica una cascata infiammatoria, a cui conseguono danni tissutali.

In seguito, sarebbe il tessuto danneggiato a predisporre il soggetto ad una maggiore suscettibilità ad altri batteri patogeni, come *P. aeruginosa*, contribuendo ad un peggiore *outcome* della

malattia. Allo stesso modo, *P. aeruginosa* potrebbe innescare la crescita selettiva come varianti a piccola colonia di *S. aureus*, con conseguente maggiore capacità di formare biofilm (11) Questo meccanismo potrebbe favorire lo sviluppo di infezioni ricorrenti-ricidivanti o croniche nella DCP.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Bush A, Chodhari R, Collins N, et al. *Primary ciliary dyskinesia: current state of the art*. Arch Dis Child 2007; 92: 1136-1140.
- (2) Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, et al. *Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features*. Am J Respir Crit Care Med 2004; 169: 459-467.
- (3) Alanin MC, Nielsen KG, von Buchwald C, et al. *A longitudinal study of lung bacterial pathogens in patients with primary ciliary dyskinesia*. Clin Microbiol Infect 2015; 21: 1093.
- (4) Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, et al. *Evaluation of a new definition for chronic Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients*. J Cyst Fibros 2003; 2: 29-34.
- (5) Möller W, Häussinger K, Ziegler-Heitbrock L, et al. *Mucociliary and long-term particle clearance in airways of patients with immotile cilia*. Respir Res 2006; 7: 10.
- (6) Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases*. Respirology 2010; 15: 1037-1056.
- (7) Ball G, Durand E, Lazdunski A, et al. *A novel type II secretion system in Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 2002; 43: 475-485.
- (8) Lee VT, Smith RS, Tümmler B, et al. *Activities of Pseudomonas aeruginosa effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection*. Infect Immun 2005; 73: 1695-1705.
- (9) Smith EE, Buckley DG, Wu Z, et al. *Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 8487-892.
- (10) Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, et al. *Prevalence and clinical significance of Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis lung disease*. J Clin Microbiol 2007; 45: 168-172.
- (11) Elias S, Banin E. *Multi-species biofilms: living with friendly neighbors*. FEMS Microbiol Rev 2012; 36: 990-1004.