



Titolo
Infezioni respiratorie virali nel paziente critico

Responsabile: Alberta Azzi

Premessa

Negli ultimi 10 anni sono stati individuati numerosi virus, precedentemente sconosciuti, causa di infezioni respiratorie. Molti di questi (quali: metapneumovirus umano, coronavirus NL e HK, bocavirus) sono virus diffusi da tempo nella popolazione umana, ma solo di recente scoperti grazie alla disponibilità di nuove metodiche. Altri sono virus effettivamente nuovi per l'uomo (coronavirus SARS, virus dell'influenza aviaria H5N1, virus influenzale pandemico 2009). In altri casi, virus noti da tempo sono emersi come patogeni importanti solo in anni più recenti (rhinovirus causa non solo di raffreddore comune ma anche di infezioni delle basse vie respiratorie). In pazienti, soprattutto in presenza di condizioni predisponenti, infezioni respiratorie virali solitamente ad andamento benigno possono causare delle malattie gravi che possono portare alla necessità di un ricovero in Unità di terapia intensiva (UTI). Nelle UTI inoltre, in seguito ai diversi possibili interventi di emergenza necessari (intubazione endotracheale, ventilazione meccanica ecc.) possono verificarsi con una certa frequenza infezioni respiratorie nosocomiali. La progressione delle infezioni così contratte può essere più grave a causa delle alterazioni dei meccanismi di difesa innati e acquisiti che spesso caratterizzano il paziente critico. Inoltre, l'alterazione delle difese immunitarie nel paziente critico può causare riattivazioni di infezioni virali endogene latenti, come nel caso del citomegalovirus (CMV) e di altri virus erpetici.

L'eziologia batterica è predominante in questo contesto, tuttavia il ruolo dei virus è attualmente sottostimato per carenza di diagnosi e per la crescente individuazione di nuovi patogeni respiratori virali. Anche se gli antivirali attualmente disponibili non coprono tutto lo spettro dei possibili virus respiratori, una diagnosi rapida di infezione virale può consentire in alcuni casi di instaurare una terapia antivirale mirata (aciclovir o foscarnet per infezioni da herpes simplex [HSV] e zoster, ganciclovir o foscarnet per infezioni da CMV) o almeno di limitare l'uso di antibiotici non utili. Quest'ultima evenienza sarebbe di fondamentale importanza sia per ridurre i costi economici (una terapia d'associazione meropenem + linezolid, ad esempio, viene a costare quasi € 200/die) sia, soprattutto, per minimizzare i rischi dell'emergenza di batteri resistenti o – ancor peggio – multiresistenti agli antibiotici: non dobbiamo infatti dimenticare quanto sia diffuso, in Europa come in Italia, il fenomeno della resistenza antimicrobica dei cocci gram-positivi (enterococchi



vancomicina-resistenti, stafilococchi meticillina-resistenti) e dei bacilli gram-negativi (enterobatteri produttori di beta-lattamasi a spettro esteso e di cefalosporinasi, bacilli non-fermentanti dei generi *Acinetobacter* e *Pseudomonas* pluriresistenti se non addirittura panresistenti).

Gli agenti di polmoniti virali più frequenti nel paziente critico sono i virus dell'influenza e, tra questi, soprattutto il virus dell'influenza di tipo A(H1N1), responsabile della pandemia del 2009, che, ha continuato a circolare anche nella stagione epidemica 2010-2011 e che, secondo attendibili previsioni di virologi ed epidemiologi, continuerà a circolare anche nei prossimi anni. Inoltre, anche altre infezioni virali possono causare polmonite, quasi certamente con frequenza minore, seppur non ben definita. Complessivamente, in più del 50% dei casi di pazienti ricoverati in UTI non è stato individuato un agente responsabile. È noto che riattivazioni di CMV nel paziente immunodepresso possono causare polmonite. Per quanto riguarda HSV, esso viene rinvenuto con una certa frequenza non solo nel faringe ma anche nel BAL di pazienti con polmonite associata a ventilazione meccanica e la sua presenza sembra associata ad una mortalità più elevata. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per chiarire il reale significato dell'individuazione di HSV in campioni respiratori profondi nel paziente critico.

Obiettivi del progetto

Obiettivo di questo progetto è quello di determinare la frequenza di infezioni respiratorie virali nel paziente critico, la fonte di infezione, la gravità e, in particolare per quanto riguarda l'infezione da HSV, il suo reale significato (patogeno primario o marker con significato prognostico negativo), nonché il ruolo di coinfezioni virali (e anche di infezioni batteriche e virali). Oltre all'individuazione di eventuali patogeni respiratori virali, un'altro obiettivo del progetto è quello di cercare eventuali biomarcatori dell'infezione, attraverso lo studio dei profili di espressione di geni cellulari coinvolti nella produzione di citochine pro-infiammatorie e nella risposta antivirale. Inoltre lo studio si prefigge anche di sviluppare metodi innovativi high throughput, in grado di dare contemporaneamente numerose informazioni (dalla identificazione del virus alla tipizzazione e alla identificazione di marker molecolari di resistenza agli antivirali o di patogenicità), a costi più contenuti, oltre che dotati della necessaria sensibilità e specificità.



Metodologie

Saranno oggetto dello studio pazienti con acute lung injury/adult respiratory distress syndrome diagnosticate con i criteri ARDS-NET ricoverati in terapia intensiva. Lo screening per la ricerca dei virus respiratori verrà eseguito su pazienti con insorgenza della insufficienza respiratoria da non più di 48 ore. Lo studio includerà anche pazienti con polmonite ricoverati in malattie infettive, pazienti ambulatoriali con malattie respiratorie lievi e anche individui asintomatici al fine di valutare la circolazione di virus respiratori nello stesso periodo, in condizioni cliniche e ambientali diverse. Oltre ai test per la diagnosi microbiologica di routine e per la ricerca dei virus erpetici, verrà eseguita la ricerca di un ampio panel di virus respiratori nei campioni clinici (tamponi nasofaringeo e anche, nel caso di pazienti in ICU, bronco aspirato o lavaggio bronco alveolare) tra cui: virus influenzali di tipo A e del sottotipo H1N1 (2009), virus influenzali di tipo B, virus parainfluenzali, coronavirus, virus respiratorio sinciziale, metapneumovirus, adenovirus, bocavirus, rhinovirus, enterovirus.

Verranno utilizzati metodi molecolari, dopo estrazione dell'acido nucleico virale dai campioni clinici, basati su PCR real time per i virus DNA e RT-PCR real time per i virus a RNA, che consentono risposte più rapide (nell'arco di alcune ore). Si ricorrerà prevalentemente a reazioni in formato "multiplex". Inoltre, per i virus influenzali e per alcuni altri virus più facilmente coltivabili, è previsto l'impiego anche dell'isolamento virale in colture cellulari, per consentire successivamente una migliore caratterizzazione dell'isolato.

In caso di positività ad uno o più virus, il paziente verrà monitorato nei giorni successivi per valutare l'andamento dell'infezione, anche in termini quantitativi.

Per quanto riguarda i virus influenzali di tipo A, sottotipo H1N1, in caso di infezioni a più lenta risoluzione, in base alle indicazioni cliniche, verrà valutato l'eventuale sviluppo di ceppi resistenti, tramite analisi delle sequenze di specifiche porzioni della neuraminidasi virale.

In un numero più limitato di pazienti dei vari gruppi, verrà analizzato il profilo di espressione di geni responsabili della produzione di citochine infiammatorie e nella risposta antivirale tramite PCR-microarrays nel tentativo di individuare eventuali "gene expression signatures" associate alle infezioni virali.

Per lo sviluppo di nuove metodiche di rilevazione dei virus oggetto dello studio si prevede di utilizzare metodiche di amplificazione di sequenze virali seguite da analisi tramite spettrometria di massa (ESI-MS o eventualmente MALDI TOF, avvalendoci dell'afferenza all'apposito Centro,



Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Sanità Pubblica
Direttore: prof. Nicola Comodo

dell'Università di Firenze). Le applicazioni di tali sistemi alla virologia sono per ora limitate, ma promettenti. Inizialmente valuteremo le possibili applicazioni alla ricerca dei virus influenzali.

Per il raggiungimento di tutti gli obiettivi lo studio avrà una durata di 3 anni. Tuttavia, già nel primo anno potranno essere ottenuti importanti risultati, ad esempio nello sviluppo di alcune metodiche previste.