

Progetti innovativi per le malattie rare

La valutazione del ruolo dei seni paranasali nell' infezione polmonare in Fibrosi Cistica

Diletta Innocenti¹, Masi Eleonora¹, Chiara Degl'Innocenti¹, Chiara Castellani¹, Matteo Masolini¹, Silvia Campana², Daniela Dolce², Novella Ravenni², Tommaso Orioli², Camera Erica², Michela Francalanci³, Giovanni Taccetti³, Silvia Bresci⁴, Giandomenico Maggiore⁵, Ferrari Beatrice¹

1 Unità Professionale di Riabilitazione, Azienda ospedaliero-Universitaria Meyer

2 Laboratorio Centro Regionale Toscano di riferimento per la Fibrosi Cistica Azienda ospedaliero-Universitaria Meyer,

3 Centro Regionale Toscano di riferimento per la Fibrosi Cistica Azienda ospedaliero-Universitaria Meyer

4 Malattie Infettive e Tropicali Azienda ospedaliero-Universitaria Careggi

5 ORL, Azienda ospedaliero-Universitaria Careggi

Abstract

Background e razionale

La Fibrosi Cistica (FC) è la malattia genetica più comune nella popolazione caucasica e colpisce oltre 80.000 pazienti in tutto il mondo (Castellani, 2018; CFF 2019), con un'incidenza in Toscana di un malato ogni 4000 neonati (Report Centro Fibrosi Cistica Meyer). L'aspettativa di vita media per i pazienti diagnosticati tramite screening neonatale si avvicina a 40 anni e la maggioranza dei pazienti italiani ha più di 18 anni. Questo risultato sorprendente è principalmente dovuto a un migliore trattamento delle infezioni respiratorie batteriche, la causa principale di danno polmonare (Castellani, 2018; CFF 2019).

Lo *P. aeruginosa* è l'agente patogeno batterico dominante con l'avanzare dell'età ed il più frequente nella popolazione adulta. Lo sviluppo dell'infezione batterica cronica da parte di *P. aeruginosa* è caratterizzata da infezione iniziale, seguita da infezione intermittente e infine da infezione cronica (presenza del batterio in oltre il 50% delle colture eseguite in un arco di tempo di 12 mesi) (Lee, 2003). L'infezione cronica è associata a una progressiva riduzione della funzionalità polmonare e ad uno stato clinico sfavorevole, e gli effetti di *P. aeruginosa* sono più gravi se l'infezione cronica si sviluppa precocemente (Castellani, 2018; Lee, 2003). L'eradicazione di *P. aeruginosa* nei pazienti con FC è considerata uno dei maggiori risultati terapeutici dell'ultimo decennio ed è stata raccomandata nelle dichiarazioni di consenso europee (Castellani, 2018). L'esperienza clinica indica però che i pazienti, dopo aver eseguito con successo il trattamento eradicato, possono essere successivamente soggetti a reinfezioni (Taccetti, 2012; Munck, 2001); dati recenti sottolineano il probabile ruolo dei seni paranasali come sito iniziale di infezione, sede di adattamento genetico e serbatoio per le successive reinfezioni da parte di *P. aeruginosa* e di altri patogeni. (Rau, 2010; Bonestroo, 2010).

È stata dimostrata una forte correlazione tra la flora colonizzante le vie aeree superiori ed inferiori (Hansen, 2012; Mainz, 2009; Johansen, 2012). Ceppi di *P. aeruginosa* isolati in entrambi le sedi anatomiche hanno lo stesso genotipo (Mainz, 2009), inoltre ceppi provenienti dai seni paranasali possiedono quelle caratteristiche tipiche dell'infezione cronica (ad esempio fenotipo mucoide) prima che queste si manifestino negli isolati nelle vie aeree inferiori.

Questa e altre osservazioni ci inducono a pensare che l'infezione nei seni paranasali possa precedere l'infezione polmonare (Folkesson, 2012; Hansen, 2012). L'infezione dei seni paranasali può rappresentare una potenziale fonte di reinfezioni anche in caso di trapianto polmonare, e pertanto è importante il monitoraggio delle vie respiratorie superiori anche in questo gruppo di pazienti (Ciofu, 2013).

I bambini e gli adulti con FC lamentano inoltre frequenti infezioni respiratorie virali causate prevalentemente dal Virus Respiratorio Sinciziale (VRS), da Rhinovirus (i più comunemente riscontrati anche nell'ambito di questa patologia), Influenza e Parainfluenza Virus e Adenovirus, che possono essere correlate ad una diminuzione della funzionalità polmonare. La vera incidenza delle infezioni virali in FC è probabilmente sottostimata poiché i virus non vengono routinariamente ricercati nei campioni respiratori e la patogenicità delle infezioni virali respiratorie a livello dei seni paranasali rimane però ad oggi non ben

esplorata. Gli studi che riguardano la situazione microbiologica a livello delle vie aeree superiori sono tuttavia difficilmente interpretabili a causa delle diverse metodiche di campionamento utilizzate. Esistono infatti vari metodi per la raccolta dei campioni dai seni paranasali che includono il lavaggio nasale secondo Mainz (Mainz, 2009), l'aspirato nasale con siringa e l'aspirato guidato da tecnica endoscopia (Møller, 2017). Una chiara definizione dell'importanza del ruolo dei seni paranasali nello sviluppo di infezioni polmonari non solo da *P. aeruginosa* ma anche da altri patogeni batterici e virali potrebbe aprire la strada al monitoraggio routinario delle infezioni a carico dei seni e ad una strategia terapeutica mirata, prospettando un miglioramento complessivo della situazione a carico di tutte le vie aeree (Folkesson, 2012; Aanaes, 2011).

Obiettivi dello studio

- valutare il ruolo delle infezioni batteriche e virali a carico dei seni paranasali nello sviluppo di successive infezioni polmonari.
- valutare il ruolo dei seni paranasali nelle re-infezioni polmonari dei pazienti sottoposti a trapianto bipolmonare,
- valutare la sensibilità, specificità e valore predittivo dei diversi approcci di campionamento utilizzati: campionamento secondo Mainz (Mainz 2009), lavaggio nasale con Ryno-set e il campionamento guidato con endoscopia
- valutare se l'approccio molecolare possa dimostrare la presenza a livello delle alte e basse vie respiratorie di patogeni batterici che sfuggirebbero con l'approccio microbiologico tradizionale;
- valutare la presenza di batteri patogeni non coltivabili con l'approccio classico a livello delle alte e basse vie respiratorie;
- valutare, a livello dei seni paranasali e delle basse vie respiratorie la presenza di virus..

Metodologia

Dimensione del campione

Numero di pazienti da arruolare

180 pazienti FC (30 soggetti sottoposti a trapianto di polmone e 150 pazienti non infettati cronicamente da *P. aeruginosa*, tutti in regolare follow-up presso Centro Regionale Toscano FC) per un totale di circa 360 campioni delle vie aeree superiori ed inferiori nel corso di 18 mesi (includendo 2 periodi invernali per valutare in modo più appropriato il ruolo dei virus)

Criteri di inclusione

Pazienti FC in grado di eseguire lavaggi nasali (età > 4 anni) inclusi i pazienti FC sottoposti a trapianto bipolmonare

Criteri di esclusione

Infezione cronica da *P.aeruginosa* nei pazienti FC non sottoposti a trapianto polmonare

Unità operative coinvolte: • Unità operativa 1 (Centro Regionale Toscano FC, AOU Meyer,) - arruolamento pazienti, analisi dei campioni, analisi dei risultati, coordinamento e report del progetto; • Unità operativa 2 (Otorinolaringoiatria, AOU Meyer) – prelievo campioni con i diversi metodi e consulenza sui seni paranasali; • Unità operativa 3 (ORL, AOU Careggi) – prelievo campioni con i diversi metodi e consulenza sui seni paranasali; • Unità operativa 4 (Malattie Infettive e Tropicali, AOU Careggi) – arruolamento dei pazienti adulti e trapiantati quando si trovano in regime di ricovero ordinario.

Il Laboratorio del Centro Regionale Toscano FC, AOU Meyer analizzerà i campioni provenienti da tutti i pazienti reclutati per il presente progetto.

Intervento/i

I campioni saranno ottenuti con tre metodi:

- Campionamento secondo Mainz (Mainz, 2009)
- Campionamento utilizzando lavaggio nasale con Ryno-set

- Campionamento materiale in endoscopia

Questi tre metodi verranno valutati anche dal punto di vista del livello di stress e invasività sul paziente secondo la scala del controllo del dolore proposto dalla regione Toscana all'interno del progetto Ospedale senza dolore (Osd) (<http://www.regione.toscana.it/cittadini/salute/dolore-e-cure-palliative/>).

I campioni delle vie aeree superiori ottenuti con gli approcci sopra descritti e i campioni delle basse vie respiratorie (tamponi faringei ed espettorati ottenuti secondo quelli che sono attualmente gli standard di cura della FC) verranno prelevati contemporaneamente e processati secondo le classiche metodiche di microbiologia seguendo Linee Guida per i pazienti FC (Raccomandazioni Gruppo Microbiologi SIFC). I pannelli utilizzati, oltre a testare la presenza dei principali virus respiratori e di alcuni batteri atipici (*Bordetella* spp, *Mycoplasma* spp, *Chlamydia* spp e *Legionella* spp.) indagano anche la presenza di un ampio spettro di patogeni polmonari batterici.

Ringraziamenti

Il progetto è finanziato dalla Regione Toscana con Fondi Regionali finalizzati alla ricerca in FC: progetto numero K37

Avanzamento dello studio

Al momento è in corso la raccolta dei campioni sul primo periodo invernale. Sono stati raccolti 57 campioni (vedi tabella 1).

Tabella 1

| Numero totale campioni | Trapiantati | | | Non trapiantati | | |
|------------------------|--------------------|----------|------------|-----------------|----------|------------|
| 57 | 7 | | | 50 | | |
| | Tipo campionamento | | | | | |
| | Mainz | Rino-set | Endoscopia | Mainz | Rino-set | Endoscopia |
| | 6 | 1 | 0 | 20 | 30 | 0 |

Bibliografia

- Aanaes K, Rickelt LF, Johansen HK, von Buchwald C, Pressler T, Hoiby N, Jensen PØ. 2011. Decreased mucosal oxygen tension in the maxillary sinuses in patients with cystic fibrosis. *Robertson, J. M., Friedman, E. M. & Rubin, B. K. Nasal and sinus disease in cystic fibrosis. J Cyst Fibros;10:114-20.*
- Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Barben J, Flume PA, Hodková P, Kashirskaya N, Kirszenbaum MN, Madge S, Oxley H, Plant B, Schwarzenberg SJ, Smyth AR, Taccetti G, Wagner TOF, Wolfe SP, Drevinek P. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *J Cyst Fibros. 2018 Mar;17(2):153-178.*
- Ciofu O, Johansen HK, Aanaes K, Wassermann T, Alhede M, von Buchwald C, Høiby N. *P. aeruginosa in the paranasal sinuses and transplanted lungs have similar adaptive mutations as isolates from chronically infected CF lungs. J Cyst Fibros. 2013;12:729-36.*
- Cystic Fibrosis Foundation Website 2019. <http://www.cff.org> (Accessed June, 2014).
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Hoiby N, Molin S. 2012. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol;10:841-51.*
- Hansen SK, Rau MH, Johansen HK, et al. Evolution and diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in the paranasal sinuses of cystic fibrosis children have implications for chronic lung infection. *ISME J 6:31-45, 2012.*
- Johansen HK, Aanaes K, Pressler T, et al. Colonisation and infection of the paranasal sinuses in cystic fibrosis patients is accompanied by a reduced PMN response. *J Cyst Fibros 11:525-531, 2012.* Lee TWR, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. 2003. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cystic Fibros; 2: 29-34.*

- Mainz JG, Naehrlich L, Schien M, et al. Concordant genotype of upper and lower airways *P aeruginosa* and *S aureus* isolates in cystic fibrosis. *Thorax* 64:535–540, 2009.
- Møller ME1, Alanin MC, Grønhøj C, Aanæs K, Høiby N, von Buchwald C. Sinus bacteriology in patients with cystic fibrosis or primary ciliary dyskinesia: A systematic review. *Am J Rhinol Allergy*. 2017 Sep 1;31(5):293-298.
- Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurkdjian P, Lebourgeois M, Gérardin M, Brahimi N, Navarro J, Bingen E. 2001. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatr Pulmonol*; 32 :288-92.
- Raccomandazioni Gruppo Microbiologi SIFC 2018 <http://www.sifc.it/documenti/linee-guida>.
- Rau MH, Hansen SK, Johansen HK, Thomsen LE, Workman CT, Nielsen KF, Jelsbak L, Hoiby N, Yang L, Molin S. 2010. Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environ Cited Literature Page 26 of 52 Microbiol*;12:1643-58.
- Taccetti G, Bianchini E, Cariani L, Buzzetti R, Costantini D, Trevisan F, Zavataro L, Campana S; Italian Group for *P aeruginosa* Eradication in Cystic Fibrosis. 2012. Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing two different protocols. *Thorax*;67:853-9.