

Le nuove metodiche di biologia molecolare per la diagnosi delle pneumopatie infettive

Nicolina Capoluongo¹
Giulia Palmiero¹
Roberto Parrella²
Carlo Tascini¹

Le infezioni delle basse vie respiratorie sono, tuttora, tra le maggiori cause di ospedalizzazione, oltre che di morbilità e mortalità tra i pazienti ospedalizzati, soprattutto nelle età estreme della vita e in particolare modo nei bambini con età inferiore ai 5 anni. Il processo infiammatorio acuto o subacuto che si instaura nelle pneumopatie infettive determina essudazione endobronchiale, interstiziale o peribronchiale.

Le polmoniti, in particolare, vengono distinte in base a criteri anatomopatologici (alveolare, interstiziale, necrotizzante), epidemiologici (CAP, VAP, HAP, *Health-care associated pneumoniae*, degli immunodepressi) o eziologici (batteriche, virali, micotiche, elmintiche). La presentazione anatomopatologica presenta, in genere, una buona correlazione con l'eziologia. Gli agenti eziologici principalmente responsabili della forma alveolare sono i bat-

teri (*Streptococcus pneumoniae* nel 70-90% dei casi, *Stafilococcus aureus* 1-5%, *Haemophilus influenzae* 1-3%, *Klebsiella pneumoniae* 1%). Batteri, quali *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii* e *Bordetella pertussis*, sono responsabili di forme interstiziali che possono essere causate anche da virus (quelli influenzali e parainflenzali, adenovirus, virus respiratorio sinciziale, coronavirus, *human metapneumovirus*, rhinovirus, *Coxsackie*, virus varicella-zoster, virus del morbillo, citomegalovirus). Gli agenti infettivi raggiungono i polmoni, in genere, per via aerea, mentre rara è la diffusione per via ematogena.

Per l'avvio del processo infettivo è necessario che il microorganismo patogeno superi le barriere di difesa e ciò può avvenire maggiormente se sono presenti fattori predisponenti quali diabete mellito, epatopatie, fumo, infezioni delle prime vie aeree, Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO), etilismo, immunodeficienza, ventilazione meccanica, eccessiva durata dell'ospedalizzazione, neoplasie, coma, in-

¹U.O.C. Malattie Infettive ad Indirizzo Neurologico, A.O.R.N. Azienda Ospedaliera dei Colli, plesso D. Cotugno, Napoli

²U.O.C. Malattie Infettive ad Indirizzo Respiratorio, A.O.R.N. Azienda Ospedaliera dei Colli, plesso D. Cotugno, Napoli, rob.parrella@gmail.com

terventi chirurgici, terapia corticosteroidica.

L'utilizzo di tecniche di biologia molecolare come la RT-PCR *Multiplex* per la diagnosi microbiologica delle infezioni respiratorie acute, consente una rapida diagnosi riducendo i costi e la durata dell'ospedalizzazione e offrendo la possibilità di un risultato preciso, nonché rapido per ciascun agente eziologico sottoposto a test, con un unico prelievo, non invasivo, quale la secrezione naso faringea. Tali test sono basati su metodiche di estrazione di DNA, amplificazione del *target* e di rilevamento. Il *Biofire FilmArray Respiratory Panel* è un test recente di biologia molecolare, rapido (durata di circa 60 minuti) che permette di individuare le sequenze di acidi nucleici di 17 virus respiratori e di 3 batteri (adenovirus, *human coronavirus HKU1*, *human coronavirus NL63*, *human coronavirus 229E*, *human coronavirus OC43*, *human metapneumovirus*, *human rhinovirus/enterovirus*, Influenzavirus A, Influenza A/H1, Influenza A/H3, Influenza A/H1-2009, Influenza B, Parainfluenza virus 1, Parainfluenza virus 2, Parainfluenza virus 3, Parainfluenza virus 4, *Human Respiratory Syncytial Virus* (RSV), *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*). Il *Panel 2* del test aggiunge agli agenti eziologici sopraelencati anche la *Bordetella parapertussis*, con un aumento della sensibilità del test e una disponibilità in circa 45 minuti del risultato (Tabella 1). In uno studio prospettico randomizzato, pubblicato sul *Journal of Clinical Virology* 2018¹, è stato dimostrato come la diagnosi eziologica sia maggiore tramite *FilmArray* rispetto all'utilizzo di test di immunofluorescenza. Inoltre, il *FilmArray* favorisce la diagnosi di co-infezione sia negli adulti che nei bambini².

Allo stato attuale, è possibile effettuare test con la PCR anche per altri batteri qua-

Virus
Adenovirus
<i>Human coronavirus 229E</i>
<i>Human coronavirus HKU1</i>
<i>Human coronavirus OC43</i>
<i>Human coronavirus NL63</i>
<i>Human metapneumovirus</i>
<i>Human rhinovirus/enterovirus</i>
Influenza A
<i>Middle East Respiratory Syncial CoronaVirus</i> (MERS-CoV)
Influenza A/H1
Influenza A/H1-2009
Influenza A/H3
Influenza B
Parainfluenza virus 1
Parainfluenza virus 2
Parainfluenza virus 3
Parainfluenza virus 4
RSV
Batteri
<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>

Tabella 1. *Biofire FilmArray Respiratory Panel 2 plus.*

li *Legionella pneumophila* e *Streptococcus pneumoniae* (*Seeplex Pneumobacter multiplex PCR*). In particolare, nel caso della *Legionella*, fino a qualche anno fa avevamo a disposizione solo il test per Ag urinario e la sierologia con una sensibilità di circa l'80%. Oggi, invece, i test molecolari per *Legionella* presentano una sensibilità che si avvicina al 100%.

Un altro test di biologia molecolare il *NxTAG Respiratory Pathogen Panel* permette di individuare in circa un'ora la presenza di 22 *target* virali e batterici tra cui Influenza A, sottotipo H1, H3, Influenza B, e altri, usando un semplice aspirato nasofaringeo (Tabella 2). Questo test è stato confrontato con il *xTAG Respiratory Panel*

Virus		
Influenza A	<i>Human rhinovirus/enterovirus</i>	Adenovirus
Influenza A/H1	Parainfluenza virus 1	<i>Human coronavirus HKU1</i>
Influenza A/H3	Parainfluenza virus 2	<i>Human coronavirus NL63</i>
Influenza B	Parainfluenza virus 3	<i>Human coronavirus 229E</i>
<i>Human Respiratory Syncytial Virus A</i>	Parainfluenza virus 4	<i>Human coronavirus OC43</i>
<i>Human Respiratory Syncytial Virus B</i>	<i>Human metapneumovirus</i>	<i>Human bocavirus</i>
Batteri		
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	

Tabella 2. NxTAG Respiratory Pathogen Panel Targets (US-IVD).

Fast v2 e il FilmArray Respiratory Panel per la diagnosi di influenza suina/aviaria³. Tutti questi test hanno presentato una sensibilità e una specificità prossima al 100%, eccetto per la NxTAG RRP che non è in grado di distinguere tra H3N2 e H3N2v.

Recentemente è diventato disponibile il Biofire FilmArray Pneumonia Panel plus, che permette di individuare 34 target in 75 minuti: 15 batteri comuni, 3 batteri atipici, 9

virus, 7 marker di resistenza antimicrobica (Tabella 3). Questo test può essere utilizzato su BAL, aspirato tracheale, espettorato o liquido pleurico e permette di individuare anche la carica tramite copie di DNA (valutazione semiquantitativa). Il risultato del test viene espresso in copie/ml rispetto alla coltura che si esprime in CFU/ml.

Questi test, ovviamente, vanno contestualizzati nel percorso clinico e microbio-

Batteri	ESBL
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex</i>	CTX-M
<i>Enterobacter cloacae</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae group</i>	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	
<i>Proteus spp.</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Batteri atipici (valutazione qualitativa)	Virus
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza A
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza B
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Adenovirus
	Coronavirus
	Parainfluenza virus
	<i>Human Respiratory Syncytial Virus</i>

Tabella 3. Biofire FilmArray Pneumonia Panel plus.



logico classico per poter effettuare la corretta diagnosi e definire una terapia antibiotica mirata. Tuttavia, nonostante i riscontri positivi sull'utilizzo di tali metodiche, rimangono alcune questioni aperte, come ad esempio: chi sottoporre ai test? Tutti i pazienti con sintomi respiratori o solo particolari categorie quali immunocompromessi, bambini, pazienti affetti da comorbidità, fibrosi cistica, pazienti in terapia intensiva in condizioni critiche? Ovviamente, sarà necessaria sempre una valutazione clinica attenta per distinguere tra microrganismi colonizzanti e patogeni prima di intraprendere un corretto percorso terapeutico.

Una menzione merita anche l'*Xpert MTB/RIF*, un'altra metodica di biologia molecolare recentemente disponibile per individuare il DNA del *Mycobacterium tuberculosis* e contemporaneamente la sua sensibilità alla rifampicina da un unico campione, mediante l'amplificazione del gene *rpoB*. La possibilità di utilizzare la metodica basata sulla identificazione di acidi nucleici del *Mycobacterium tuberculosis* dal campione di liquido biologico (più semplicemente espettorato, ma nel campo delle pneumopatie anche dal BAL, broncoaspirato e liquido pleurico) permette in tempi celeri di individuare la presenza del bacillo anche in caso di carica microbica bassa, ossia a esame microscopi-

co negativo con la possibilità aggiuntiva di identificare precocemente ceppi resistenti. In ogni caso, bisogna ricordare che in questo campo il *gold standard* rimane sempre l'esame colturale. Inoltre, questo test non risulta utile nel *follow-up* dei pazienti affetti da TB. Da sottolineare che l'alto valore predittivo negativo di questo test permette di non sottoporre i pazienti con sospetto di TB a test inutili, invasivi e costosi.

In definitiva, questi test rappresentano una rivoluzione per la medicina simile all'introduzione della TC e della RM perché permetteranno di fare la diagnosi eziologica in modo sicuro e veloce. Il tema del futuro sarà capire quanto il Sistema Sanitario Nazionale potrà risparmiare con diagnosi eziologiche e terapie mirate, rispetto all'uso dissennato della terapia antibiotica empirica.

Bibliografia

- 1) ECHAVARRÍA M, MARCONE DN, QUERCI M, ET AL. *Clinical impact of rapid molecular detection of respiratory pathogens in patients with acute respiratory infection*. J Clin Virol 2018;108:90-5.
- 2) CHEN JHK, LAM HY, YIP CCY, ET AL. *Clinical evaluation of the new high-throughput luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel assay for multiplex respiratory pathogen detection*. J Clin Microbiol 2016;54:1820-5.
- 3) CHAN KH, TO KKW, LI PTW, ET AL. *Evaluation of NxTAG Respiratory Pathogen Panel and comparison with xTAG Respiratory viral Panel Fast v2 and Film Array Respiratory Panel for detecting respiratory pathogens in nasopharyngeal aspirates and swine/avian-origin Influenza A subtypes in culture isolates*. Adv Virol 2017. DOI: 10.1155/2017/1324276.