



European Commission
EC Structural Funds



Ministero dell'Università
e della Ricerca Scientifica
e Tecnologica



Università degli Studi di
Catania

DOTTORATO DI RICERCA IN INFEZIONI IN CHIRURGIA
GENERALE, IN CHIRURGIA GERIATRICA ED IN
OSTETRICIA E GINECOLOGIA
Ciclo XXIII
Facoltà di Medicina e Chirurgia
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

Dott.ssa Concetta Ilenia Palermo

RUOLO DELLE INFEZIONI ERPETICHE NELLE AFFEZIONI
RESPIRATORIE DI PAZIENTI CRITICI SOTTOPOSTI A
VENTILAZIONE ASSISTITA

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa Annamaria Speciale

Tutor:

Chiar.mo Prof. Guido Scalia



TRIENNIO 2007 - 2010

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 3 |
| <i>1.1. Premessa</i> | 3 |
| <i>1.2. Herpesvirus</i> | 5 |
| <i>1.3. Ciclo replicativo</i> | 12 |
| <i>1.4. Latenza</i> | 18 |
| 2. PATOLOGIA E PATOGENESI | 23 |
| <i>2.1. Epidemiologia</i> | 31 |
| <i>2.2. Diagnosi</i> | 33 |
| <i>2.3. Terapia e profilassi</i> | 36 |
| 3. MATERIALI E METODI | 38 |
| <i>3.1. Campioni</i> | 38 |
| <i>3.2. Isolamento virale e tipizzazione</i> | 43 |
| <i>3.3. Estrazione degli acidi nucleici</i> | 45 |
| <i>3.4. Amplificazione degli acidi nucleici</i> | 46 |
| 4. RISULTATI | 49 |
| 5. DISCUSSIONE | 54 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 64 |

INTRODUZIONE

1.1 Premessa

Le patologie a carico dell'apparato respiratorio destano particolare interesse per la gravità del processo morboso, e soprattutto, per l'alta percentuale di mortalità che si riscontra al livello globale. Dati riportati dall'Organizzazione Mondiale di Sanità (OMS), infatti, denunciano il continuo aumento della loro incidenza, proponendo una previsione per il 2020 di terza causa di morte nel mondo. In base alla parte di polmone interessata e alla modalità di acquisizione dell'evento morboso, distinguiamo tra le più gravi patologie respiratorie, le affezioni delle basse vie respiratorie (Lower Respiratory Tract Infections, LTRI), le polmoniti acquisite in comunità (Community-Acquired Pneumonia, CAP) e le forme nosocomiali. Le LTRI includono tutti i processi infettivi a carico del parenchima polmonare (polmoniti) e dei bronchioli (bronchioliti); le CAP, in base alle diverse fasce

d'età e alle diverse categorie a rischio (es. soggetti immunodepressi) in cui insorgono le polmoniti, presentano un quadro clinico di differente gravità e possono richiedere l'ospedalizzazione del paziente. Per quanto concerne le polmoniti definite nosocomiali, esse vengono distinte in polmoniti acquisite in ambiente ospedaliero (Hospital-Acquired Pneumonia, HAP), per le quali la sintomatologia si manifesta oltre 48 ore dopo il ricovero; le Healthcare-Associated Pneumonia (HCAP), tipiche dei pazienti sottoposti a procedure mediche o provenienti da strutture di lungodegenza; le Ventilator-Associated Pneumonia (VAP), che si osservano dopo almeno 48 ore dall'intubazione endotracheale. La consapevolezza di trovarsi di fronte in presenza di una patologia complessa ed ad alto impatto sociale, ha spinto molti ricercatori a valutarne i principali possibili agenti etiologici. Tuttavia, la molteplicità delle possibili cause, come infezioni singole persistenti o in combinazione con altre forme microbiche, rendono difficile la definizione dell'effettivo ruolo di ciascuno di essi.

1.2 Herpesvirus

Focalizzando l'attenzione sulle infezioni persistenti, in particolare su quelle di natura virale, la famiglia Herpesviridae potrebbe essere una delle più importanti. Infatti, a causa delle peculiarità dei virus ad essa appartenenti e del loro rilevante potenziale patogeno, questa famiglia è da considerarsi di primo piano nell'insorgenza di patologie respiratorie nel paziente immunodepresso o nelle complicanze di tali patologie qualora determinate da altri fattori. Questa famiglia è composta da numerosi membri, almeno 150, alcuni dei quali capaci di infettare l'uomo. Gli Herpesvirus appartengono alla famiglia degli Herpesviridae ed in relazione alle indicazioni dello "Study Group of the International Committee on the Taxonomy of Viruses", basate sulle differenti proprietà biologiche dei vari virus, sono divisi in tre sottofamiglie: Alphaherpesvirinae che

includono l'herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV1 e HSV2) e il varicella zoster (VZV), nei quali la latenza si ha principalmente a livello dei gangli dei nervi sensitivi; i Betaherpesvirinae, tra cui il citomegalovirus (CMV), le cui sedi di latenza sembrano essere le ghiandole salivari, i tubuli renali ed alcune cellule ematiche; i Gammaherpesvirinae di cui fa parte il virus di Epstein-Barr (EBV), persistono esclusivamente nelle cellule linfoidi (Fauquet et al., 2005). Le tre sottofamiglie non differiscono solo per le proprietà biologiche ed i siti di latenza, ma si distinguono anche sulla base dello spettro d'ospite, del sito di infezione acuta e delle manifestazioni cliniche. Dei nove membri in grado di infettare l'essere umano, solo uno di essi viene trasmesso come infezione zoonotica, dalle scimmie all'uomo, provocando una fatale encefalomielite (Huff et al., 2003). Gli Herpesvirus, dopo il primo contatto, possono instaurare una infezione di tipo latente che persiste per tutta la vita dell'ospite, durante la quale vengono espressi solo alcuni geni virali. A seguito di particolari condizioni si può verificare la riattivazione del

virus (infezione ricorrente), caratterizzata da espressione di alcune proteine virali (VPs) e produzione di progenie virale; a tale condizione segue la trasmissione del virus da un soggetto infetto ad un ospite suscettibile. Dal punto di vista morfologico, la particella, di forma sferica con diametro di 150-200 nm, rivela quattro elementi strutturali, che dall'interno all'esterno, sono di seguito elencati:

- il core
- il capside, costituito da 162 capsomeri
- il tegumento, composto da uno strato elettron denso di natura proteica distribuito asimmetricamente
- il pericapside o envelope di natura lipoproteica provvisto di numerose e corte proiezioni definite "spikes" (fig.1).

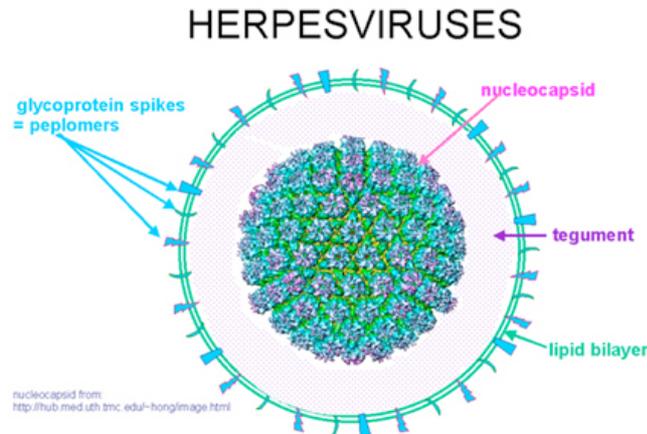


Fig.1: Struttura degli herpesvirus

Il core, rappresentato dal genoma virale, si presenta a forma di torus avvolto a gomitolo ed associato a materiale proteico (Falke et al. 1959; Nazerian 1974; Roitzman et al., 1974; Furlong et al., 1972). Dati rilevati dalla microscopia elettronica suggeriscono come il DNA sia fisicamente ancorato al capsid per mezzo di fibrille di natura proteica, le quali si legano alla sua superficie interna ed attraversano la porzione centrale del torus. L'ancoraggio delle estremità terminali del genoma al capsid, inattiva il processo di trascrizione proteica virale, che ha inizio subito dopo l'entrata del materiale genetico nel nucleo della cellula ospite. Il genoma virale è rappresentato da una molecola di DNA lineare a doppio

filamento (DNA bicatenario), da 120 a 200 kbp, caratterizzata da due sequenze uniche, denominate U, delle quali una lunga, UL, ed una corta, Us, separate da due sequenze ripetute interne, IRL e IRs (Internal Repeats), invertite rispetto alle due sequenze analoghe presenti alle estremità del genoma, TRL e TRs (Terminal Repeats). Queste componenti possono invertirsi ed orientarsi diversamente nelle varie sottofamiglie, le une con le altre, dando origine a quattro o due possibili isomeri lineari indicati come P (prototype) di molecole di DNA, rispettivamente come accade per HSV e VZV, riscontrabili anche nei virus wild-type (Roitzman et al., 2003). Come dimostrato da studi con virus mutati, mancanti della maggior parte delle sequenze interne ripetute ed invertite, queste regioni del DNA non sono essenziali per la crescita del virus in vitro (Jenkins et al. 1986). Il secondo elemento strutturale è rappresentato dal capsido (100-110 nm in diametro), con simmetria icosaedrica, composto da 162 capsomeri arrangiati in 12 pentameri e 150 esameri. Le proteine virali VPs (5, 19c, 23 e 26), aggregati in pentoni ed esoni, sono associate a triplette polipeptidiche per formare il

“nucleocapside”. Il capsid è accessibile per via transcapsomeric, ovvero il passaggio attraverso canali formati dall'arrangiamento polipeptidico di pentoni, esoni e fori alla base di ogni tripletta. Si pensa che tali aperture svolgano un ruolo rilevante nel trasporto genomico del DNA e nell'assemblaggio delle proteine durante la morfogenesi del capsid. Tra il capsid e l'envelope è presente il tegumento (Roitzman et al., 1974). La struttura del tegumento appare particolare (Grünwald et al. 2003), giacché è costituita da alcuni piccoli filamenti simil-actinici. Sono presenti da 25 a 30 proteine virus specifiche; di queste almeno 15 sono localizzate sulla superficie del virione e almeno 11 sono glicosilate. Queste proteine sembra che svolgano fondamentali funzioni durante gli stadi precoci della replicazione virale che segue la penetrazione del virus nella cellula ospite. Il pericapsid, oltre ad essere costituito da glicoproteine, è composto anche da lipidi; tale concerto di sostanze conferisce al virus una particolare sensibilità verso i solventi organici (Honest et al., 1989; Spear et al., 1972; Spring et al., 1972). Uno dei geni che codifica per una importante glicoproteina del pericapsid è

localizzato in un gruppo di geni che mostra omologie con gli altri virus erpetici. Ci si riferisce a questo gene come a gB (per omologia con l'analogo gene in HSV, EBV e VZV), ed è probabilmente da considerare quale gene ancestrale, generalmente conservato in tutti i sottogruppi della famiglia Herpesviridae (Marche et al. 1986). Il gene gB codifica per la proteina gB del pericapside, del peso di circa 100 Kd. Un altro gene, denominato gH (per omologia con l'analogo gene in HSV), codifica per una proteina del pericapside del peso di 87Kd. Tra le glicoproteine identificate a livello del pericapside vengono menzionate, oltre alle succitate gB (VP7 e VP8,5) e gH anche la gC (VP8), la gD (VP17-18), la gE (VP12,3 e VP12,6), la gG e la gI. La costruzione dell'envelope, infine, si compie durante il passaggio del virus attraverso la membrana cellulare (Armstrong et al., 1961; Falke et al., 1959; Morgan et al., 1959), a differenza della sintesi del DNA virale e l'assemblaggio del capside che avvengono nel nucleo della cellula infetta.

1.3 Ciclo replicativo

In accordo con gli altri membri della sottofamiglia Alphaherpesvirinae, HSV1 si replica in maniera relativamente rapida (18-24h) e le cellule infette vengono sempre distrutte. Situazione differente si riscontra in Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae, nelle quali il ciclo replicativo è molto lento, si producono inclusioni nucleari e citoplasmatiche come, ad esempio, succede nelle infezioni da CMV. La replicazione dei virus erpetici ha inizio con l'adsorbimento e, successivamente, la penetrazione della particella virale nella cellula, processi mediati da diverse glicoproteine virali (gp) dell'envelope, precedentemente citate e responsabili, inoltre, delle maggiori differenze antigeniche tra i virus erpetici (Bergström e Trybala, 1996). Nello specifico, durante l'adsorbimento del virus pare vengano coinvolte le glicoproteine virali C e B, le quali si legano all'eparin-solfato dei glicosaminoglicani della superficie cellulare. La penetrazione è mediata da una terza proteina, la glicoproteina D, che interagisce alternativamente con uno dei tre recettori: la

nectina 1, membro di una famiglia di molecole intracellulari di adesione; l'HVEM, mediatore di penetrazione del virus; il 3-O-solfato eparin-solfato (Campadelli-Fiume et al.,2007; Reske et al., 2007). Il legame della glicoproteina D, in concorso con le glicoproteine B ed un eterodimero di glicoproteine H ed L, innesca il processo di fusione dell'envelope con la membrana plasmatica cellulare, seguito dal rilascio del nucleocapside nel citoplasma della cellula infetta (fig.2).

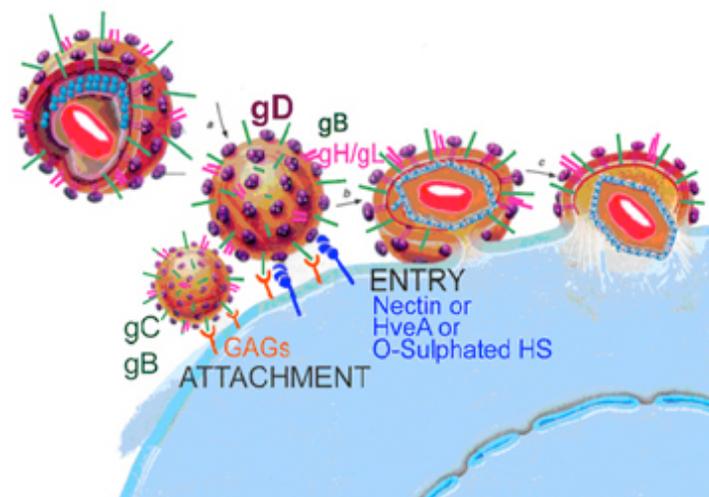


Fig.2: Adsorbimento e penetrazione del virus mediati dal complesso glicoproteico (gp)

Il capsid si avvicina ai pori della membrana nucleare, per mezzo dei microtubuli del citoscheletro cellulare (Batterson et al., 1983; Tognon et al., 1981) ed il DNA virale viene liberato all'interno del nucleo, dove, dopo aver assunto

una conformazione circolare, viene trascritto per opera della RNA polimerasi II cellulare. La trascrizione del DNA ha inizio con il legame tra il DNA circolarizzato ed alcuni fattori trascrizionali cellulari di seguito elencati: Octomer binding protein (OTC-1), α -TIF ed un fattore addizionale C1 (fig.3).

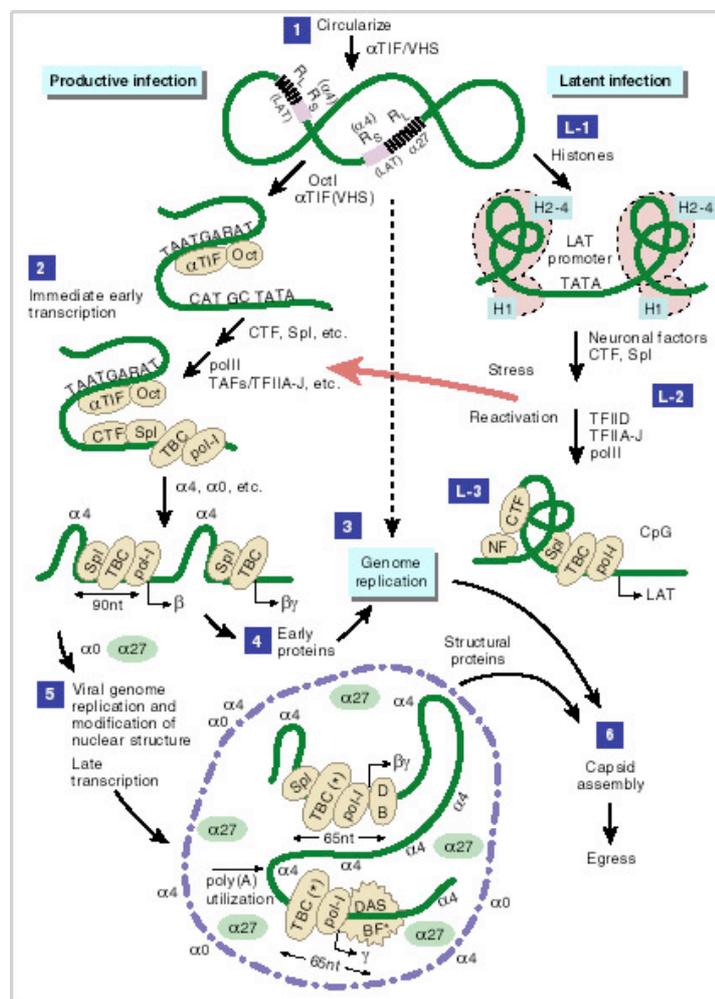


Fig.3: Tipi di meccanismi trascrizionali attivi nel processo di replicazione del DNA virale nella fase produttiva e in quella litica

Il processo è caratterizzato dall'espressione di tre classi principali di geni denominati α , β e λ , che sono espressi in modo coordinato secondo una successione a cascata altamente regolata (Gibson et al., 1972; Nesburn et al., 1967). I geni α , denominati "immediati precoci", sono dotati d'attività regolatoria nei riguardi della trascrizione degli altri geni, compresa la trascrizione del gene associato alla latenza (LAT-1) (fig.4).

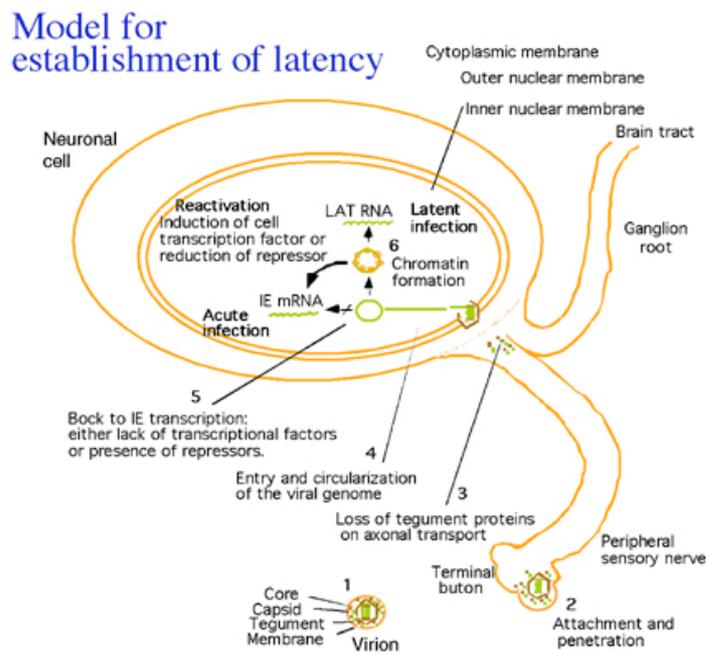


Fig.4: Modello del meccanismo di latenza del virus

I geni β , denominati “precoci”, sono indispensabili per il metabolismo degli acidi nucleici e la replicazione del DNA determinando la produzione d’enzimi quali le timidino-chinasi. I geni λ , denominati “tardivi”, sono deputati alla produzione di proteine strutturali, fondamentale impiegate nella morfogenesi virale. L’espressione dei geni α è significativamente ridotta in seguito alla replicazione del DNA; di contro vengono espressi ad alti livelli i geni tardivi (fig.5).

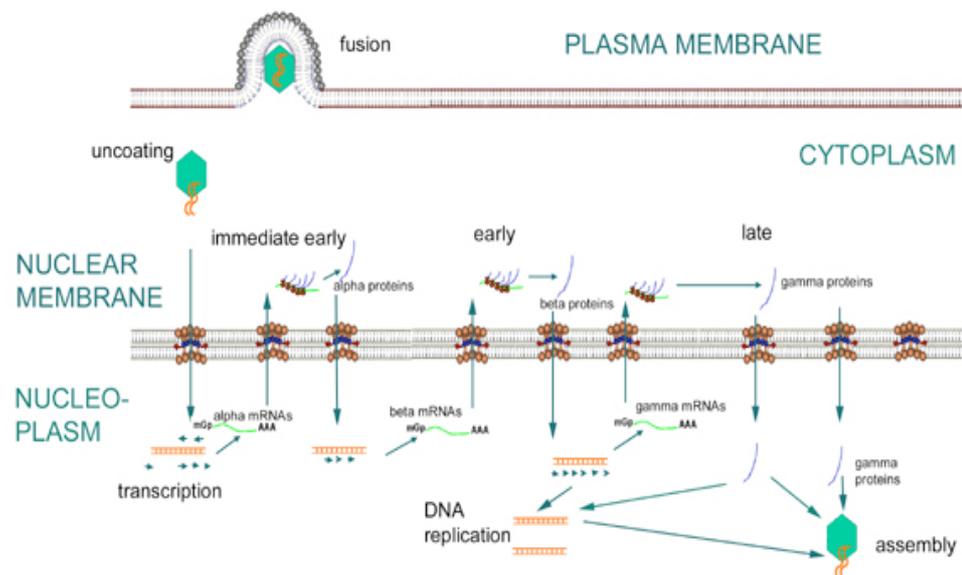


Fig.5: Successione a cascata dell’espressione genica di α , β e λ

Il DNA virale replica secondo il meccanismo del cerchio rotante; una volta ottenuto il replicato, questo viene clivato ed impacchettato all'interno del nucleocapside. Vengono descritti tre possibili modelli per comprendere il rilascio dei nucleocapsidi maturi: nel primo modello, i virioni dopo aver ricevuto l'envelope dalla membrana nucleare, vengono trasportati in vescicole per essere liberati negli spazi intercellulari; nel secondo modello, i virioni acquisiscono e successivamente perdono il pericapside di origine nucleare, ma riacquistano l'envelope dalla membrana citoplasmatica; nel terzo modello, i capsidi attraversano i pori nucleari dilatati e ricevono il pericapside dalla membrana citoplasmatica. Come prima accennato, la replicazione virale negli Alphaherpesvirinae conduce inevitabilmente alla lisi della cellula ospite, che avviene entro 36 ore dopo l'infezione; sin dall'inizio del ciclo a causa dell'inibizione compiuta dalle proteine virali nei riguardi delle sintesi macromolecolari della cellula, il nucleo presenta dapprima alterazioni a carico della cromatina e quindi grosse inclusioni nucleari, acidofile, contenenti anche abbondante materiale virale (Roitzman et al.,

1974). Nel caso dei Betaherpesvirinae, il CMV viene considerato come modello replicativo: 8-10 giorni dopo l'infezione, le cellule assumono un marcato e caratteristico aumento di volume e per questa ragione la cellula infettata viene definita "citomegalica"; esse vanno incontro a lisi, che però non è mai totale.

1.4 Latenza

Come già detto, l'interesse clinico per i virus erpetici nasce soprattutto dalla loro capacità di mantenersi allo stato latente per molti anni o per tutta la vita dell'individuo.

Tra i virus erpetici emerge, come agente infettante di particolare interesse nelle LTRI e nelle VAP, l'HSV1. HSV1 è stato tra i primi herpesvirus umani ad essere scoperto ed è, tra tutti i virus, uno dei più studiati. Esso causa una varietà di infezioni che coinvolgono la superficie mucocutanea, il sistema nervoso centrale ed alcuni organi quali il polmone (Corey et al., 2000; Whitley et al., 2002). Il primo caso in si correlò

HSV1 alla polmonite, fu esposto nel 1949 da Morgan e Finland (Morgan e Finland, 1949) e tale associazione fu considerata un evento raro fino a venti anni dopo. In seguito all'esaurimento della fase clinica dell'infezione primaria, l'HSV1 si localizza nei neuroni dei gangli dei nervi sensitivi (fig.6), in particolare nel trigemino (Baringer, 1976; Baringer et al., 1973; Bastai net al., 1972), che pare sia il sito di latenza più comunemente riconosciuto ma soprattutto il sito di origine dell'HSV1 orofaringeo e labiale.

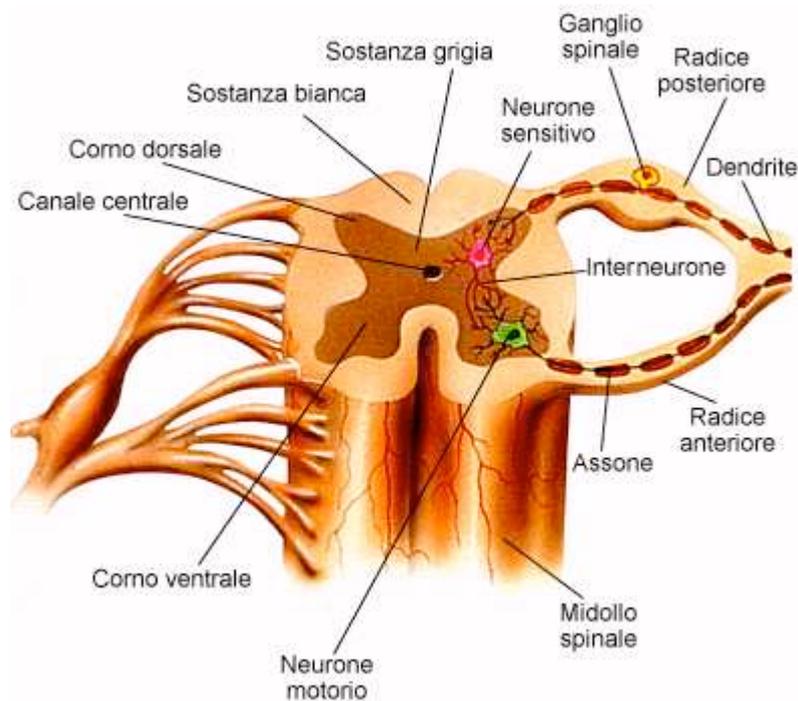


Fig.6: I neuroni dei gangli dei nervi sensitivi: siti di latenza di HSV1

Successivamente Warren et al. (1978) identificarono altri due siti di latenza: i gangli superiori cervicali ed il ganglio vagale, postulando come la prima sede possa essere sorgente di HSV nelle encefaliti erpetiche e la seconda sia fonte di virus a livello esofageo e al basso tratto respiratorio (fig.7).

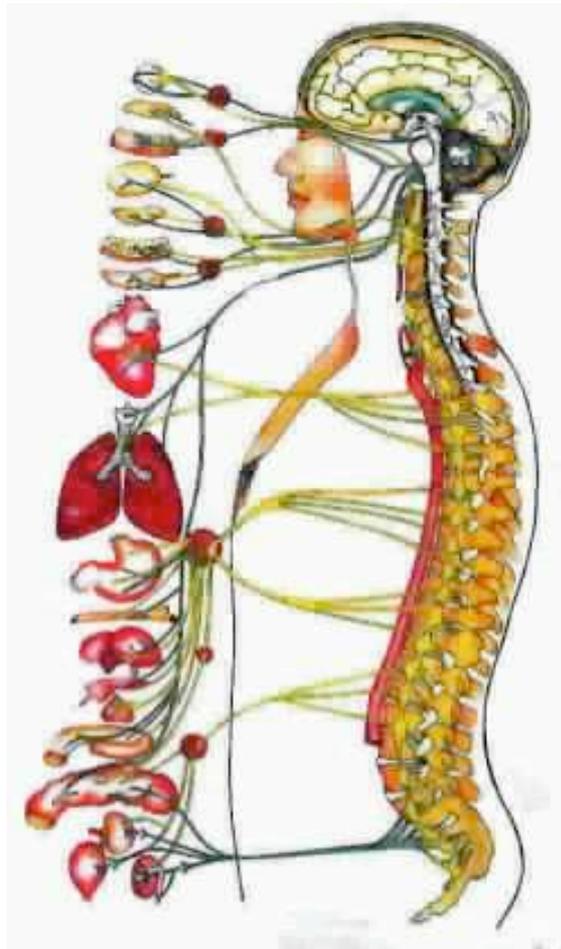


Fig.7: Differenti sedi in cui il virus può manifestarsi in seguito a riattivazione

In tutte queste sedi, il virus rimane in un apparente stato inattivo (Roizman, 1968; Roizman et al., 1987; Stevens, 1975).

Durante lo stato di latenza, non è possibile rilevare alcun virione, così come non vengono espressi gli antigeni virali; situazione che accomuna quasi tutti gli esponenti dei sottogruppi della famiglia Herpesviridae. L'unica espressione genica è rappresentata da trascritti del gene LAT (Latency-Associated-Transcripts) all'interno dei gangli infetti o in qualsiasi altra sede albergante il virus erpetico; non viene osservata, quindi, nessuna espressione dei geni VP. Sulla base di tale concetto, il mantenimento del genoma erpetico pare sia considerato un meccanismo passivo. Tuttavia, modelli animali dimostrano bassi livelli di replicazione del genoma virale, allo stato di latenza segue la riattivazione del virus. L'introne LAT è stabile all'interno dei nuclei delle cellule infette con virus latente. Ad oggi, non è ancora chiaro come i virus, con delezione del gene LAT, siano in grado di instaurare il meccanismo di latenza e per quali meccanismi i virus con blocco del gene LAT, del suo promotore o di una sequenza a 348 bp nella terminazione 5' di LAT, manifestino una ridotta efficienza di riattivazione. Nonostante le scarse conoscenze sugli introni LAT, tra le principali funzioni ascritte ad essi, è

nota la capacità di “down-regulation” dei geni litici, di blocco della trascrizione di un potente gene transattivatore di capsidazione (ICPO) e la protezione dall’apoptosi dei neuroni infetti.

La latenza può essere interrotta da numerose circostanze, che in qualche modo alterano il suo equilibrio: tali fattori scatenanti possono essere sia sistemici, come mestruazioni, febbre, traumi ed immunodepressione, sia locali come danno tissutale o radiazioni ultraviolette, oppure altri processi infettivi (Roitzman, 1987). E’ meno noto, invece, come VZV mantenga lo stato di latenza, nei gangli trigemino e toracico, e quali siano gli stimoli che scatenino la riattivazione del virus. Durante la latenza, il DNA virale pare esista in forma episomale e differenza di quanto avviene per HSV, non si osserva alcun trascritto del gene LAT all’interno dei gangli infetti; diversamente a HSV, durante lo stato di latenza, vengono espresse delle proteine ORFs 4, 21, 29, 62 e 63 (Mahalingam et al., 1996; Lungu et al., 1995) presenti sia nel citoplasma sia nel nucleo di cellule neuronali e non-neuronali (Lungu et al. 1995).

2. PATOLOGIA E PATOGENESI

L'infezione primaria da HSV1 nella maggior parte dei casi è asintomatica, mentre in altri si manifesta con gengivostomatite acuta (Burnett et al., 1939) caratterizzata da eruzioni vescicolari raggruppate o singole a livello della giunzione mucocutanea delle labbra o a carico delle mucose buccali, che evolvono successivamente in ulcere dolorose e fastidiose (Spruance et al., 1982; Spruance et al., 1977; Young et al., 1976). Nel caso di VZV, i casi sintomatici variano da forme lievi, rappresentate da eruzioni cutanee di tipo papuloso che si trasformano in vescicole seguite da guarigione spontanea, a forme più gravi come la polmonite. Questa si verifica in 1 su 200.000 bambini ed in 1 su 200 soggetti immunocompetenti. L'infezione primaria da CMV di norma decorre in modo asintomatico o paucisintomatico caratterizzato da astenie, febbre, mialgia, adenomegalia e a livello ematologico da linfocitosi. In rari casi si sviluppa una sindrome similmionucleosica con potenziali complicanze come polmoniti, epatiti e meningiti. Nel soggetto

immunocompetente, grazie alla risposta immunitaria, sia cellulare sia umorale, anche l'infezione da EBV manifesta un decorso di norma subclinico; tuttavia è possibile associare direttamente o come cofattore la presenza del virus ad uno stato severo di malattia. EBV presenta uno spiccato potere oncogeno tanto da essere associato a tumori quali linfomi (Jones et al., 1988), linfoma di Hodgkin's (Anagnostopoulos et al., 1989) e carcinoma dello stomaco (Imai et al., 1994).

La via di trasmissione, comune alla maggior parte degli erpetici, è il contatto diretto tra soggetto infetto ed individuo suscettibile, mediante superfici mucose o cutanee infette o saliva; fa eccezione VZV che può trasmettersi anche attraverso goccioline di aerosol. Prendendo specificamente in considerazione HSV₁, dopo contatto diretto, il virus penetra a livello delle mucose orofaringee o attraverso lesioni cutanee con successiva moltiplicazione; a questo stadio può seguire una viremia di breve durata. Durante questa fase il virus, venuto a contatto con i recettori cutanei dei nervi sensitivi cranici o spinali, può penetrarvi e risalire verso il ganglio, per mezzo del trasporto retrogrado facilitato dai microtubuli

dell'assone (Diefenbach et al., 2008). In seguito alla riattivazione, il virus prodotto migra lungo le terminazioni nervose fino a giungere alle zone cutanee innervate, dove si ha poi la manifestazione erpetica (fig.8).

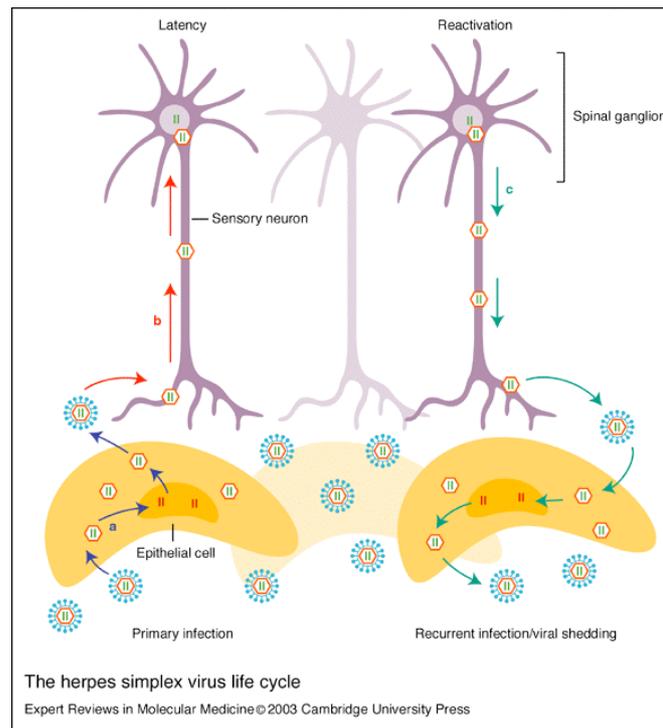


Fig.8 Trasporto retrogrado ed anterogrado del virus lungo le terminazioni nervose

L'immunità umorale e quella cellulo-mediata limitano l'infezione del virus nel ganglio infetto; infatti l'incremento di citochine, chemochine e CD8⁺T riducono la carica virale dopo circa sette giorni. Poiché l'infezione primaria ha spesso un

decorso asintomatico, la riattivazione potrebbe essere la prima manifestazione clinica di infezione che si presenta con una patologia meno grave. La ridotta gravità dello stato morboso è riconducibile alla presenza di anticorpi specifici che determinano una più veloce risoluzione dell'infezione stessa.

Le infezioni sintomatiche sono ad appannaggio di determinate categorie di soggetti nei quali il sistema immunitario fisiologicamente (neonati o anziani), per cause iatrogene (nei soggetti sottoposti a trattamenti immunosoppressivi perché riceventi trapianto), per cause genetiche o, infine, per patologie (come nel caso di pazienti oncologici, diabetici o HIV positivi) non rispondono adeguatamente agli stimoli antigenici (Rudolf et al., 1990).

La comparsa o meno della sintomatologia e la sua gravità dipendono in maniera rilevante dal sistema immunitario; è stato osservato, infatti, che in caso d'immunodepressione, l'infezione erpetica ricorre in modo più grave e prolungato manifestandosi sia a livello oculare sia a livello del SNC, causando encefalite (fig.9). Nei pazienti immunosoppressi, il virus può albergare anche a livello del tratto intestinale e delle

alte e basse vie respiratorie (Whitley et al., 2002) provocando in quest'ultimo, a seguito di riattivazione, esofagite erpetica (Buss et al., 1969), trachoebronchiti e polmoniti (Bruynseels et al., 2003).

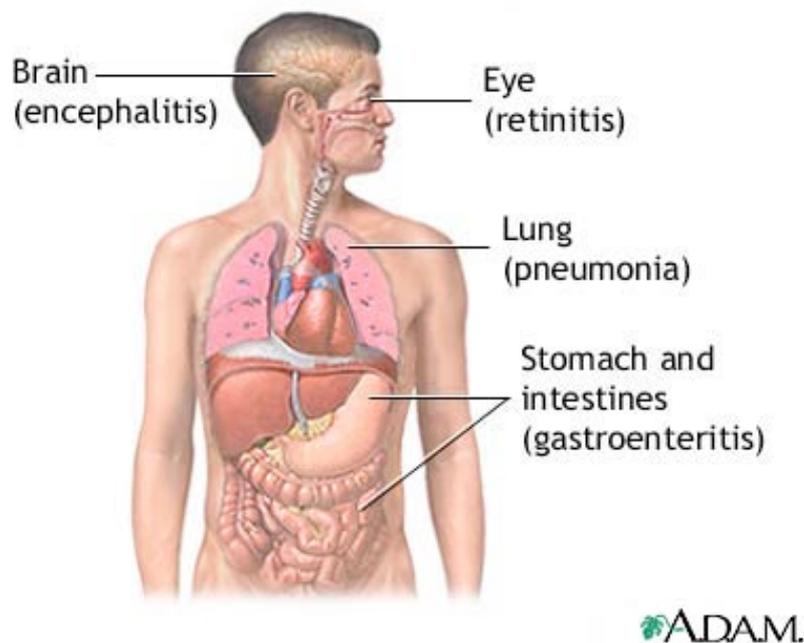


Fig.9 : Principali localizzazioni degli Herpesviridae

La riattivazione del virus non è l'unica ipotesi avanzata per la quale si verificano affezioni respiratorie. Si pensa infatti, che il virus possa infettare l'epitelio squamoso ed indurre metaplasia in seguito a diversi fattori scatenanti quali traumi, ustioni, radio o chemioterapia, che predispongono il paziente all'infezione da HSV1 nel basso tratto respiratorio (Graham et

al., 1989). Inoltre, la metaplasia potrebbe verificarsi come risposta secondaria all'infezione stessa; infatti secondo Sherry e collaboratori (1988) il virus provoca cambiamenti citotossici nella mucosa respiratoria, con conseguente distruzione della superficie protettiva mucociliare.

Secondo diversi ricercatori, traumi subiti in seguito ad intubazione o ventilazione meccanica, predispongono le vie aeree ad infezioni erpetiche polmonari (Schuller et al., 1983; Castleman et al., 1973; Nash, 1972; Nash et al., 1970).

I traumi delle vie aeree rendono la trachea più suscettibile all'infezione erpetica, giacchè permettono al virus di migrare dal cavo orale alla trachea diffondendosi per contiguità (Nash, 1972; Ramsey et al., 1982). In questo caso, il virus attivo diffonde per "contiguità" dalle lesioni mucocutanee o orofaringee al parenchima polmonare; questa locale diffusione secondo Ramsey e collaboratori (1982) e Corey e collaboratori (1986) provoca una polmonite necrotizzante focale. Si ipotizzano altre due vie di trasmissione: la trasmissione ematogena (Ramsey et al., 1982) e la riattivazione dell'infezione latente nel ganglio vagale (Tuxen et al., 1982).

Secondo la prima ipotesi, le particelle infette traslocano dallo strato interno del tubo endotracheale alle basse vie respiratorie; a questa modalità di trasmissione segue la polmonite interstiziale (Ramsey et al., 1982). Il secondo meccanismo propone un tipo di trasmissione secondo cui, il virus riattivato nel ganglio vagale migra lungo il vago e raggiunge il parenchima polmonare (Tuxen et al., 1982). Secondo diversi studi, l'infezione da HSV₁ nel tratto respiratorio superiore è comune e generalmente auto-limitante; di contro, l'infezione si manifesta raramente nel medio e basso tratto respiratorio di soggetti adulti immunologicamente normoergici e viene diagnosticata quasi esclusivamente nei soggetti immunocompromessi. La risposta immune dell'ospite ha un impatto importante sull'acquisizione, severità, latenza e frequenza della ricorrenza dell'infezione erpetica.

Nel caso di VZV la polmonite interstiziale si sviluppa in più del 32% dei soggetti con deficit immunologico, con un tasso di mortalità superiore al 25% (Feldmann e Lott, 1987). Negli immunocompromessi causa una patologia progressiva in

seguito alla facilitata diffusibilità agli organi interni (polmoni, fegato, etc.).

Il CMV è un agente infettivo opportunista. Contrariamente a quanto accade nei soggetti immunocompetenti, negli immunocompromessi l'infezione si manifesta con un quadro clinicamente impegnativo. Infatti, la reinfezione endogena o esogena da CMV può provocare gravi complicanze o addirittura la morte in soggetti trapiantati in cui si possono verificare disfunzioni renali gravi o addirittura rigetto. Nei trapiantati di midollo, cuore, polmone, si possono avere conseguenze a carico dell'apparato respiratorio; nei soggetti HIV positivi, il CMV può determinare coinvolgimento dell'apparato gastrointestinale (lesioni e perforazioni dell'intestino), del SNC (infiammazioni cerebrali e possibile danno alla retina e alla coclea) e del polmone. Infatti, la comparsa di una polmonite interstiziale accompagnata da febbre elevata pare sia la complicanza più grave e si stima che possa raggiungere, proprio in questi casi, una percentuale di mortalità addirittura dell'80-90%.

Per ciò che riguarda HHV7, 'altro esponente dei Betaherpesvirinae, non è possibile attribuire con certezza ad esso alcuna patologia di particolare rilievo; nei soggetti trapiantati sono state descritte varie patologie concomitanti con infezione da HHV7, ma l'esistenza di un diretto rapporto etiologico rimane incerta perché spesso risultano presenti anche altri virus quali CMV e/o HHV6.

2.1 Epidemiologia

Dal punto di vista epidemiologico, le infezioni da herpesvirus sono ubiquitarie ed endemiche nell'ambito d'ogni popolazione e non dispongono di alcun serbatoio animale. L'infezione primaria da herpesvirus (HSV1, EBV ed HHV7) si verifica generalmente durante l'infanzia, entro i primi 5 anni di vita, infatti il 90-95% dei giovani adulti (a seconda delle aree geografiche e delle condizioni socio-economiche) ha già contratto l'infezione primaria e possiede anticorpi; tuttavia il titolo anticorpale tende progressivamente a diminuire. Meno diffusa è l'infezione da HSV2 (5-10% in Europa e 30% negli

USA) così come quella da VZV (60% dei casi). Dal 40 all'100% della popolazione dei Paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui dei Paesi in via di sviluppo, vanno incontro ad infezione da CMV (Landini MP., 1992); di norma, l'infezione decorre asintomatica nei soggetti immunocompetenti, inducendo latenza in monociti, epitelio dei tubuli renali, epitelio delle ghiandole salivari etc.

Si ritiene che gli esseri umani siano l'unico *reservoir* per gli herpesvirus umani e che la trasmissione avviene per contatto interumano diretto, a causa della labilità del virus in ambiente extracellulare, o, più raramente, indiretto. Il propagarsi dell'infezione è favorita dal fatto che il virus viene eliminato per periodi molto lunghi e dal tipo d'infezione che decorre in modo asintomatico o paucisintomatico, compatibile con una normale vita di relazione del soggetto infetto. Le fonti di infezione sono rappresentate da liquidi biologici vari o vescicole contenenti virus attivo.

2.2 Diagnosi

Nonostante si pensi che l'uso dell'isolamento virale in molti laboratori di virologia clinica sia in declino, a tutt'oggi il loro impiego rimane un indispensabile strumento di analisi nei laboratori specializzati per la valutazione della vitalità e della cinetica del virus. I virus erpetici, ad eccezione di EBV e di alcuni virus erpetici umani di più recente scoperta (HHV6, HHV7 ed HHV8), sono facilmente coltivabili in colture cellulari in monostrato, primarie, semicontinue e continue, in cui è possibile osservare l'effetto citopatico (CPE) da uno a sette giorni dopo l'inoculazione del materiale biologico. L'efficacia e la sensibilità del metodo si basano su un buon campionamento (prelievo e trasporto) che preservi l'infettività del virus. Al metodo tradizionale possono essere applicate delle variazioni come il sistema definito shell vial che prevede la centrifugazione del campione patologico trattato sul monostrato cellulare su cui è stato inoculato; a questa segue l'identificazione del virus mediante l'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro gli antigeni virali. Solitamente tale

metodica viene applicata per discriminare HSV₁ da HSV₂ mediante l'uso di specifici anticorpi monoclonali marcati. Metodiche alternative alle colture virali, come ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) o IFA (Immunofluorescence assay), atte alla valutazione della risposta anticorpale, vengono applicate per la diagnosi di prima infezione o indagini epidemiologiche. La ricerca di anticorpi, come indagine diagnostica, viene utilizzata anche e soprattutto nei casi in cui si voglia valutare l'immunità del soggetto, o qualora vi sia sospetto di infezione in assenza di sintomatologia evidente, o nei casi in cui non sia possibile ottenere l'isolamento per un pregresso trattamento antivirale specifico del paziente. La diagnosi sierologica basata sull'evidenza di un eventuale movimento anticorpale su doppio campione di siero, è estesamente impiegata ma non è particolarmente utile nelle recidive, nelle quali il livello totale di anticorpi spesso non si modifica in misura apprezzabile. Attualmente vengono largamente utilizzate metodiche di biologia molecolare, PCR o real-time PCR, che offrono un'alta sensibilità accompagnata da ridotti rischi di cross-

contaminazione dei campioni intra-laboratorio e consente tempi ridotti di esecuzione. Inoltre, contestualmente al rilevamento dell'acido nucleico virale, mediante real-time PCR, si ottiene una stima quantitativa del virus e la sua tipizzazione. Una particolare considerazione, tuttavia, deve essere fatta sull'importanza del rilevamento di DNA virale in patologie in cui le infezioni ricorrenti (asintomatiche) sembra non abbiano alcuna rilevanza. In questi casi, onde reperire proprio nel tessuto alterato il virus, si potrebbero impiegare altre indagini come l'ibridazione in situ o la PCR in situ che rilevano l'acido nucleico virale direttamente su campione bioptico opportunamente trattato. Le sezioni bioptiche paraffinate vengono inizialmente disidratate e successivamente reidratate e digerite con proteinasi K. Dopo denaturazione, la sezione di tessuto viene incubata insieme ad una sonda specifica complementare al DNA bersaglio del virus. La sonda viene marcata con traccianti di diversa natura. Purtroppo per la loro complessità tecnica, si preclude il loro impiego nelle pratiche diagnostiche di routine e la loro applicazione si può avere solo in laboratori di riferimento o di riconduce ricerca.

2.3 Terapia e profilassi

Sono stati descritti diversi farmaci con attività anti-erpetica in vitro. Attualmente, per le infezioni da herpes simplex virus e VZV, sono di notevole utilità l'aciclovir ed alcuni suoi profarmaci (famciclovir e valacyclovir), analoghi dei nucleosidi che bloccano la replicazione virale; lo stesso meccanismo d'azione si ripropone con il foscarnet, unico farmaco applicato nelle infezioni da EBV. Tali farmaci godono, inoltre, di notevole selettività d'azione, consentita dal fatto che la prima fosforilazione avviene solo per opera della timidino-chinasi di HSV o VZV. Sono farmaci virostatici, di conseguenza è di cruciale importanza iniziare il trattamento terapeutico all'esordio dell'infezione erpetica. Sono stati suggeriti altri composti che mirano ad attaccare la primasi-elicasi dell'HSV (Biron, 2007), buone candidate nella combinazione con qualsiasi terapia immunosoppressiva ma con efficienza limitata per l'insorgenza di ceppi resistenti. Varianti resistenti all'aciclovir possono insorgere per mutazioni sia nella timidino-chinasi che nella DNA-polimerasi. Gli analoghi dei

nucleosidi di seconda generazione, brivudina e derivati, hanno trovato applicazione molto limitata in seguito ad interazioni tra farmaci come il fluorouracil, utilizzato nella terapia contro il cancro. Il trattamento di infezioni erpetiche nell'ospite immunocompromesso appare di cruciale importanza per la possibilità di insorgenza di infezioni generalizzate multi-organo o superinfezioni batteriche. In casi di immunosoppressione iatrogena, l'infezione erpetica è un indicatore temporale di riassetto del dosaggio della terapia immunosoppressiva.

Per le strategie di profilassi sono di largo impiego i vaccini attenuati anti-VZV (come il ceppo OKA) inizialmente applicati solo nei bambini immunodepressi; oggi il loro uso è stato esteso anche a bambini e adolescenti sani. Sono stati proposti vaccini anti-HSV ed anti-CMV, con virus vivi ed attenuati o subunità virali, ma nessuno di questi è attualmente in uso in profilassi per l'inadeguatezza della risposta immunitaria evocata (Kemble e Spaete, 2007).

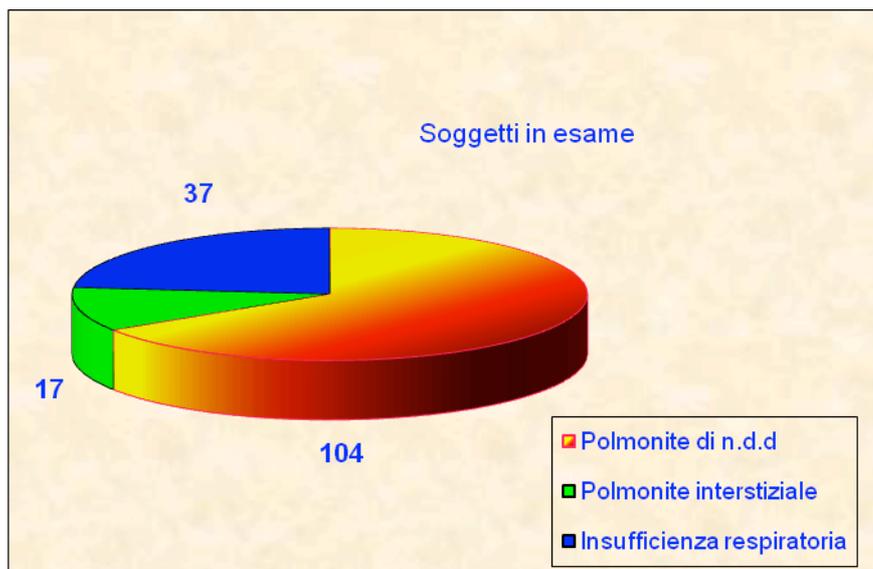
3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

Lo studio, retrospettivo, è stato condotto presso l'unità di Virologia Clinica del Laboratorio Analisi dell' A.U.O. Policlinico-Vittorio-Emanuele, Presidio Ospedaliero "Gaspare Rodolico" di Catania. Sono stati analizzati 158 campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) ottenuti tra il gennaio 2007 e l'ottobre 2009 e provenienti da altrettanti pazienti (63 femmine e 95 maschi) di età compresa tra 18 ed 84 anni (media 51 anni), ricoverati presso le UTI di alcuni nosocomi della città di Catania, per i quali era stata posta diagnosi di polmonite nel 65,8% dei casi (104/158), di polmonite interstiziale nel 10,7% (17/158) e di insufficienza respiratoria nel 23,4% (37/158) (graf.1).

Inoltre, venivano inclusi nello studio pazienti ventilati meccanicamente da almeno 48h e le cui caratteristiche cliniche rientravano in almeno una delle seguenti condizioni: trapianto di organo solido (SOT), trapianto di midollo osseo (TMO) o

altre condizioni di immunosoppressione (malattie ematologiche gravi, uso prolungato di steroidi) (tab.1).



Grag.1: Soggetti affetti da gravi patologie respiratorie arruolati nello studio

| Pazienti | Polmonite | Polm.Inter. | Ins.resp. | Totale |
|-------------------|-----------|-------------|-----------|--------|
| SOT | 6 | 1 | 2 | 9 |
| TMO | 9 | 5 | 6 | 20 |
| Terapia Steroidea | 14 | / | 3 | 17 |
| LH oLNH | 31 | 7 | 10 | 48 |
| LAM o LLA | 44 | 4 | 16 | 64 |
| Totale | 104 | 17 | 37 | 158 |

Tab.1: Distribuzione dei pazienti sulla base delle caratteristiche cliniche

L'evoluzione clinica dei pazienti veniva valutata in base alle indicazioni ottenute dal SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score (Ferreira et al. 2001).

Dei BAL in esame:

- 9 provenivano da pazienti trapiantati di organo solido;
- 20 provenivano da soggetti con TMO;
- 17 campioni appartenevano a pazienti sottoposti a terapia steroidea prolungata;
- 48 campioni erano ottenuti da soggetti affetti da Linfoma di Hodgkin (LH) e Linfoma non Hodgkin (LNH)
- 64 BAL derivavano da soggetti con patologie ematologiche gravi, quali leucemia mieloide acuta (LAM) e leucemia linfoblastica acuta (LLA).

Le caratteristiche dei pazienti studiati sono riassunte in tab.2

| | SOT | TMO | LH o LNH | LAM o LLA | Terapia Steroidea | Totale |
|--|------------|------------|------------|------------|-------------------|----------|
| Sesso M (F) | 3 (6) | 13 (7) | 32 (27) | 37 (27) | 10 (7) | 95 (53) |
| Età (Media) | 19-73 (45) | 23-84 (55) | 18-84 (53) | 18-81 (49) | 20-77 (49) | - |
| Durata di ventilazione assistita (Media) | 4-7 (4) | 3-11 (5) | 2-11 (6) | 2-11 (6) | 2-11 (6) | - |
| <7 gg di ventilazione meccanica (%) | 7 (4%) | 12 (7,5%) | 19 (12%) | 35 (22%) | 7 (4%) | 80 (51%) |
| >7 gg di ventilazione meccanica (%) | 2 (1%) | 8 (5%) | 29 (18%) | 29 (18%) | 10 (6%) | 78 (49%) |

Tab.2: Sesso, età e durata di ventilazione assistita dei pazienti arruolati nello studio

Le procedure di prelievo dei BAL venivano eseguite come descritto da Linszen e colleghi. (2004). I campioni di BAL venivano trasportati entro 15 minuti dal prelievo e processati, immediatamente all'arrivo, nel Laboratorio di Virologia.

Dieci ml di BAL pretrattati con penicillina-streptamicina-anfotericina B a 4°C per 20 minuti e quindi centrifugati per 20 minuti a 1200 rpm. Il pellet, così ottenuto, veniva particellato in due eppendorf sterili (DNA-RNAasi free) nella quantità di 2ml ciascuno. Di queste, una veniva utilizzata

per l'isolamento in colture cellulari idonee, l'altra per l'estrazione dell'acido nucleico virale.

3.2 Isolamento virale e tipizzazione

L'isolamento veniva effettuato fondamentalmente per HSV₁ e CMV, adottando il metodo di centrifugazione dell'inoculo nelle cellule ed il rilevamento degli antigeni virali con immunofluorescenza come descritto da Costa e colleghi (2007). Venivano impiegate, quindi, cellule di rene di scimmia verde africana (B-VERO) per la ricerca di HSV₁ e fibroblasti polmonari fetali umani (MRC5) per la ricerca di CMV, coltivate rispettivamente in Medium 199 e Minimum Essential Medium (MEM), quest'ultimo completato con Piruvato di Sodio all'1% e aminoacidi non essenziali all'1%. Inoltre, in entrambi i terreni si aggiungeva siero bovino fetale (FCS) al 2%, penicillina, streptomina e amfotericina B. In una prima fase, le cellule venivano coltivate in fiasche di polistirene e portate a confluenza. Le cellule confluenti venivano sottoposte a tripsinizzazione e ripartite in una concentrazione di $1,5 \times 10^5$ cells/ml in piastre a 24 pozzetti; ciascun pozzetto conteneva un vetrino coprioggetti circolare sterile (12 mm in diametro) su cui venivano fatte aderire le cellule. Queste raggiungevano la

confluenza idonea per l'isolamento virale il giorno successivo alla preparazione della piastrina; venivano, quindi, inoculati 200 µl di BAL pretrattato come sopraindicato. Si provvedeva alla centrifugazione della piastra a 1500 rpm per 45 minuti a 35°C e quindi all'incubazione a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂ fino alla lettura della piastra al microscopio rovesciato. I vetrini che contenevano cellule con evidente effetto citopatico (CPE), venivano fissati in metanolo-acetone in rapporto di 1:2 e successivamente trattati con i seguenti anticorpi monoclonali: CHA 437 diluito 1:15 in tampone appropriato per HSV e clone E13 diluito 1:50 in PBS con aggiunta di albumina all'1% per CMV. Quindi, venivano incubati a 37°C per 30 minuti. Si procedeva aggiungendo anti-IgG di topo marcate con FITC, come anticorpo secondario e diluito 1:100 in PBS con aggiunta di Blu di Evans all'1% (Argene, Biosoft, France). I vetrini venivano letti al microscopio a fluorescenza.

3.3 Estrazione acidi nucleici

Veniva impiegato un sistema di estrazione automatico, Nuclisens® EasyMag Biomérieux, basato sulla tecnologia di estrazione con la silice (detta anche tecnologia di BOOM). Durante l'incubazione dei campioni lisati con Lysis Buffer, contenente tiocianato di guanidina, l'acido nucleico veniva catturato da particelle di silice magnetica. Il dispositivo magnetico del Nuclisens® EasyMag attrae la silice, dando la possibilità al sistema di purificare gli acidi nucleici attraverso una fase di lavaggi ripetuti eseguiti mediante l'impiego di due tamponi differenti (Fig.10).

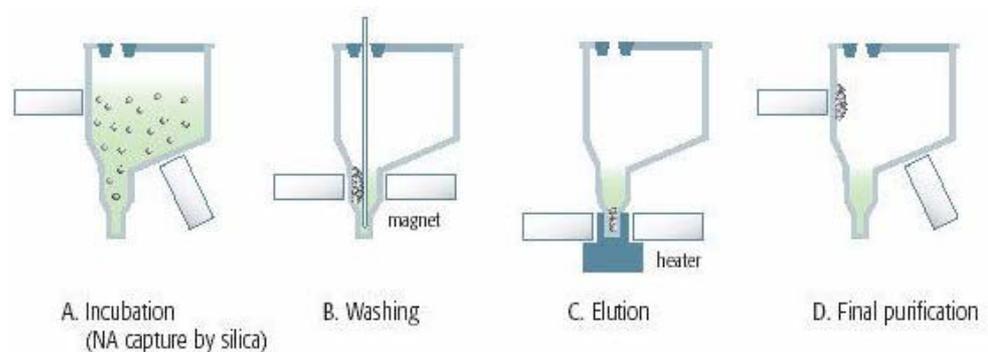


Fig.10: Metodo di estrazione basato sulla tecnologia di BOOM

Al termine del ciclo di lavaggio segue una fase di riscaldamento atta a liberare gli acidi nucleici dalla silice ed una fase finale in cui le particelle di silice magnetica vengono separate dall'eluato attraverso il dispositivo magnetico.

3.4 Amplificazione degli acidi nucleici

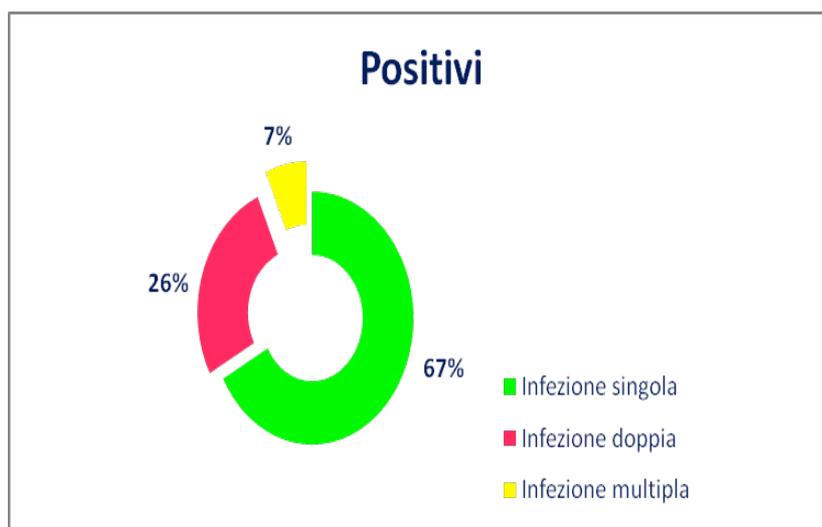
L'amplificazione dell'acido nucleico dei virus erpetici (HSV1, CMV, EBV ed HHV7) veniva eseguita mediante una metodica di PCR qualitativa in "house" utilizzando un termociclatore Perkin Elmer GeneAmp 9700 Thermo Cycler (Applied Biosystem, Monza, Italia), rispettando i parametri standardizzati in precedenti ricerche. I primers esterni per il I° ciclo di amplificazione e gli interni per il II° erano stati costruiti sulle sequenze genomiche ottenute da NCBI GenBank, nella regione dei geni codificanti la gpD di HSV1 (regione US6), la proteina MIEA di CMV (major immediate early antigen, HCMVUL 123), la proteina EBNA-1 di EBV e la proteina del capsido di HHV7 (regione U57). I campioni positivi per HSV1, CMV ed EBV venivano successivamente

confermati e quantizzati, con l'utilizzo di kit commerciali di real-Time PCR (Q-HSV1, Q-CMV e Q-EBV Real-Time Complete Kit, Nanogen Advanced Diagnostics, Milano, Italia). La reazione di amplificazione veniva eseguita con un ABI PRISM 7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Monza, Italia) utilizzando la tecnica Taqman. Le amplificazioni avvenivano all'interno di un volume di 25 µl contenenti 5 µl di DNA estratto o controllo negativo o diluizioni in base 10 degli standard (plasmide virale) e 20 µl di amplimaster: amplimix + ampliprobe Q-HSV1 Alert Kit (Nanogen). Il profilo termico delle reazioni era: 50°C per 2', denaturazione iniziale di 95°C per 10' seguita da 45 cicli a 95°C per 15" (denaturazione) e 60°C per 1' (annealing ed estensione). La quantizzazione del DNA veniva calcolata in riferimento alla curva standard costruita sulla base del ciclo soglia Ct (Cycle threshold) di ciascuna delle diluizioni in base 10 dei plasmidi considerati nella corsa. I dati di amplificazione venivano analizzati dal Sequence Detection System software (Applied Biosystems) e ciascun campione veniva validato anche sulla base della presenza nel pozzetto corrispondente del gene housekeeping

(beta-globina), utilizzato quale controllo interno di estrazione.
I risultati venivano considerati accettabili con un Ct della beta-globina inferiore a 39.

4. RISULTATI

Dei 158 BAL analizzati il 57,6% (91/158) conteneva il DNA di almeno uno dei virus ricercati. Nel 67% dei positivi si evidenziava infezione singola, nel 26% infezione doppia e nel 7% infezione multipla, intesa come positività per più di due virus erpetici (graf. 2).



Graf.2: Percentuali di positività delle infezioni singole, doppi e multiple

Inoltre dei soggetti su cui veniva posta diagnosi di polmonite, insufficienza respiratoria e polmonite interstiziale veniva rilevato acido nucleico per almeno uno dei virus erpetici

saggiati rispettivamente nel 63,4% (6/104), nel 56,7% (21/37) e nel 58,8% (10/17).

I risultati ottenuti in nested-PCR sono esposti in tab.3.

| | HSV1(%) | CMV(%) | EBV(%) | VZV(%) | HHV7(%) |
|------|----------|----------|----------|--------|------------|
| HSV1 | 11 (7%) | 3 (2%) | 1(0,6%) | 0 | 8 (5,1%) |
| CMV | 3 (2%) | 2 (1,3%) | 0 | 0 | 4 (2,5%) |
| EBV | 1 (0,6%) | 0 | 9 (5,7%) | 0 | 8 (5,1%) |
| VZV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HHV7 | 8 (5,1%) | 4 (2,5%) | 8 (5,1%) | 0 | 39 (24,7%) |

Tab.3: Positività singole e doppie per ciascun herpesvirus

La correlazione tra i dati ottenuti dalle metodiche di biologia molecolare ed isolamento virale, in riferimento al CMV ed HSV1, sono riassunti in tab.4.

| | PCR+(%) | PCR-(%) | Totale(%) |
|-------------|-----------|------------|------------|
| CMV=158 | | | |
| Isolamento+ | 5 (3,1) | 0 | 5 (3,1) |
| Isolamento- | 12 (7,6) | 141 (89,2) | 153 (96,8) |
| Totale | 17 (10,7) | 141 (89,2) | 158 |
| HSV1=158 | | | |
| Isolamento+ | 10 (6,3) | 0 | 10 (6,3) |
| Isolamento- | 20 (12,6) | 128 (81) | 148 (89,9) |
| Totale | 30 (19,9) | 128 (81) | 158 |

Tab.4: Correlazione tra le positività rilevate in PCR ed isolamento virale per HSV1 e CMV

Sulla base di quanto descritto in letteratura da De Vos et al. (2008) si è valutato un punto di riferimento, definito come maggiore rischio di infezione, identificato in giorni dopo l'inizio della ventilazione assistita; quindi si correlava la presenza o assenza di DNA virale nei prelievi di BAL entro 7 giorni (<7gg) o oltre i 7 giorni (>7gg) dall'inizio della ventilazione assistita. I dati sono mostrati in tab.5.

| | PCR | PCR | Totale | p value |
|------------|-----|-----|--------|-------------------------|
| CMV=158 | | | | |
| VAP* >7 gg | 8 | 70 | 78 | N.S** |
| VAP<7gg | 9 | 71 | 80 | |
| Totale | 17 | 138 | 158 | |
| HSV1=158 | | | | |
| VAP >7 gg | 20 | 58 | 78 | $\chi^2 = 4,43, P<0,05$ |
| VAP<7gg | 10 | 70 | 80 | |
| Totale | 30 | 120 | 158 | |
| EBV=158 | | | | |
| VAP >7 gg | 9 | 69 | 78 | N.S** |
| VAP<7gg | 17 | 63 | 80 | |
| Totale | 26 | 132 | 158 | |
| HHV7=158 | | | | |
| VAP >7 gg | 37 | 41 | 78 | N.S** |
| VAP<7gg | 31 | 49 | 80 | |
| Totale | 68 | 90 | 158 | |

Tab.5: Rilevamento di acido nucleico virale prima di 7 giorni (<7gg) o dopo 7 giorni (>7 gg) dalla ventilazione polmonare assistita* (VAP); **Non significativo

La prevalenza di HSV1 correlata al numero di giorni di VAP (>7 giorni) era statisticamente significativa (20/158, 12,6%), con valori di $\chi^2 = 4,43$ ($P<0,05$) rispetto ai dati osservati per CMV (8/158, 5,06%), EBV (9/158, 5,7%), ed HHV7 (37/158, 23,4%) che risultavano essere non significativi. I risultati di CMV ed EBV qPCR erano compresi nel range di 10^2 - 10^4 gEq/ml a differenza di HSV1 qPCR in cui la carica virale arrivava fino a 10^8 gEq/ml con un limite basso equivalente agli altri virus. Di tutti i pazienti positivi per HSV1 il 33,3% (10/30) presentava una carica virale di $\geq 10^5$ gEq/ml e

di questi il 30% (3/10) raggiungeva un viral load di 10^8 gEq/ml. In tutti i soggetti in cui veniva riscontrata una carica virale $\geq 10^5$ gEq/ml l'outcome risultava essere fatale dopo pochi giorni dalla diagnosi microbiologica nonostante il trattamento con aciclovir. Diciassette soggetti su trenta (55%) venivano trattati con aciclovir e i restanti 13/30 (45%) non ricevevano alcun trattamento antivirale; solo 7/30 (23%) sono sopravvissuti, i rimanenti sono deceduti (77%) (tab.6).

| | Pazienti HSV1 Positivi | | | | | |
|-----------------|------------------------|---------|------------|---------------|----------|------------|
| | Aciclovir | | Totale | Sopravvissuti | | Totale |
| | Si (%) | No (%) | N. (%) | Si(%) | No (%) | N. (%) |
| Insuf respir* | 3 (10%) | 7 (23%) | 10 (33,3%) | 2 (7%) | 8 (27%) | 10 (33,3%) |
| Polmonite | 14(47%) | 5 (16%) | 19 (63,3%) | 5(16%) | 14 (47%) | 19 (63,3%) |
| Polmon.inter**. | - | 1 (3%) | 1 (3,3%) | - | 1 (3) | 1 (3,3%) |
| Totale | 17(57%) | 13(43%) | 30 | 7(23%) | 23 (77%) | 30 |

Tab.6: Soggetti HSV1 positivi sopravvissuti o morti, sottoposti a trattamento antivirale e non. * Insuf. respir.= insufficienza respiratoria; ** Polmon.inter.= polmonite interstiziale

5. Discussione

Le patologie a carico delle basse vie respiratorie sono considerate tra le più importanti cause di morbidità e mortalità a livello mondiale. La loro incidenza è in continuo aumento tanto che, come detto, l'OMS stima che nel 2020 tali patologie rappresenteranno la terza causa di morte nel mondo. E' indispensabile conoscere quali siano i fattori di rischio predisponenti o gli agenti etiologici che stanno alla base di tali forme morbose. I batteri ed i miceti vengono comunemente riconosciuti come agenti etiologici più frequenti, soprattutto in pazienti con patologie respiratorie che richiedono ventilazione assistita; per questo motivo la richiesta di indagini virologiche, fuori da periodi epidemici specifici, è un fatto infrequente. L'incidenza delle infezioni virali, pertanto, è stata per lungo tempo sottostimata probabilmente a causa della ridotta disponibilità di laboratori specializzati e della scelta dei virus da ricercare, limitata solo ai "tradizionali" virus respiratori. Di norma, nelle patologie respiratorie ad etiologia virale sono chiamati in causa, infatti, i Paramyxovirus e gli

Orthomyxovirus, mentre i virus erpetici fanno parte raramente dei protocolli diagnostici. Da circa 70 anni si cerca di valutare la loro importanza nelle affezioni respiratorie dei pazienti critici, tuttavia i pareri discordanti e i dubbi sulla rilevanza clinica di queste infezioni, rendono ancora più ardua l'interpretazione dei dati.

Quindi, si è ritenuto interessante, visto il discreto numero di BAL disponibili, fare una valutazione sul ruolo di alcuni virus erpetici nella nostra casistica confrontando, in particolare, l'incidenza di HSV1 con quella degli altri esponenti della stessa famiglia ed il suo reale impatto clinico. E' noto come alcuni virus erpetici, come VZV e CMV, possano causare polmoniti quale complicanza dell'infezione soprattutto nei pazienti immunocompromessi. In comparazione, l'associazione tra HSV1 e affezioni respiratorie è stata riportata per la prima volta nel 1949 da Morgan e Finland, isolando il virus direttamente in sede polmonare da un paziente affetto da polmonite atipica. Allora, tale evento veniva considerato estremamente raro, mentre attualmente, i più recenti dati indirizzano ad una rivalutazione di HSV1, discostandosi in

modo rilevante dalla precedente realtà. Tutto ciò ha spinto molti ricercatori a studiare nuove strategie basate sull'impiego di tecniche molecolari, quale la real-Time PCR, indirizzate non solo al reperimento del DNA virale ma, contestualmente, alla sua quantizzazione, con il fine di definire la soglia di viral load che possa avere una significatività clinica effettiva. Le metodiche molecolari garantiscono un livello di sensibilità non riscontrabile con altre tecniche; tuttavia, a causa della caratteristica capacità dei virus erpetici ad instaurare infezioni di tipo latente, la diagnosi diventa inevitabilmente complessa e a volte si rischia, con l'esclusivo impiego della PCR, di sovrastimare il dato. Da quanto detto sembra importante seguire protocolli diagnostici che prevedano l'impiego sia di metodologie molecolari sia di tecniche convenzionali quale l'isolamento virale.

Oggetto di questo studio è stato la valutazione del possibile ruolo sia degli agenti erpetici virali più frequentemente correlati a patologie respiratorie, VZV e CMV, sia di altri virus erpetici finora più raramente associati a manifestazioni respiratorie gravi. I soggetti presi in

considerazione rientrano certamente nel novero dei pazienti immunodepressi, dal momento che venivano indirizzati al nostro laboratorio campioni clinici prelevati da soggetti con SOT, TMO, leucemici e riceventi terapia immunosoppressiva; questi sono da considerarsi tutti casi in cui può sussistere il dubbio di reinfezione erpetica nel tratto respiratorio che potrebbe insorgere probabilmente a seguito di ventilazione assistita e, certamente, dell' immunodepressione. Lo stato di debilitazione generalizzata nel paziente immunocompromesso produce squilibrio osmotico, disfunzione endocrina e fallimento circolatorio e respiratorio che necessitano di un approccio immediato in terapia intensiva. Il deficit più importante, però, è quello riconducibile alla risposta immunologica dell'ospite in considerazione del fatto che ha un impatto notevole sull'acquisizione, severità, latenza e ricorrenza dell'infezione erpetica. A dimostrazione di ciò, Schuller et al. (1993), attraverso uno studio condotto su pazienti con immunodeficienza cellulare, hanno osservato come l'infezione erpetica si manifesti in forma più severa e con un'estensione maggiore nella zona interessata.

Si è ritenuto opportuno valutare alcuni parametri più importanti: il tipo di patologia respiratoria del paziente, la durata della degenza in UTI, lo stato d'immunodepressione, i giorni di ventilazione assistita e, se applicato, il trattamento terapeutico antivirale. A seguito dei nostri risultati c'è sembrato opportuno evidenziare alcuni di questi parametri per poter effettuare una schematizzazione di massima, utile per l'eventuale elaborazione di "linee guida" che possano dare indicazioni sulla formulazione di protocolli diagnostici e terapeutici per pazienti critici, come quelli oggetto del nostro studio. Sulla base dei risultati ottenuti, un discorso a parte va fatto per HHV7 per il quale il reperimento di acido nucleico virale, mediante nested-PCR, è sostanzialmente maggiore rispetto agli altri virus; questo dato si allinea con quelli riportati in letteratura (Astegiano et al. 2010). Tuttavia, nonostante l'elevata frequenza con cui è stato reperito il DNA di HHV7 nei campioni di BAL analizzati, sia da solo sia in associazione con altri herpesvirus, è ancora poco chiara l'influenza che l'infezione da HHV7 possa avere sul rischio di evoluzione della patologia respiratoria. Uno studio condotto

nel 2006 (Watzinger et al. 2006) evidenzia la particolare sensibilità delle metodiche di PCR che può determinare una sovrastima del dato epidemiologico sì da indurre una difficoltà interpretativa e quindi, come nel caso di HHV7, un dubbio diagnostico di rilievo legato a possibile sovra o sottostima. Un altro dato importante è la mancata possibilità di distinguere l'HHV7 latente dal virus riattivato. Per esso, così come per EBV, non è prevista la coltura in vitro mediante metodi tradizionali, sicché non è stato possibile eseguire l'isolamento virale; così come, invece, è stato fatto per HSV1 e CMV. Ciò ci impedisce di comprendere se si tratta di un virus attivo o meno. La comparazione dei risultati ottenuti con le due metodiche applicate, evidenzia come sia HSV1 che CMV rispondano, come virus attivo certamente replicante, in 1/3 dei BAL positivi in PCR. In effetti, valutando criticamente i risultati ottenuti mediante real-time PCR, HSV1 sembra rivestire un ruolo preminente rispetto a CMV in questi pazienti. Vagliando il viral load dei vari herpesvirus sia dopo 48h dall'intubazione sia dopo 5-7 giorni dall'inizio della ventilazione assistita, è stato osservato un significativo

incremento del viral load fino e oltre i 10^8 gEq/ml solo per HSV1. Così come riportato da altri studi (Bruynseels et al., 2003; Tuxen et al., 1982; Luyt et al., 2007), anche il nostro evidenzia una significativa correlazione tra l'intubazione prolungata e l'elevato viral load per HSV1. Il reperimento di HSV1 nelle basse vie respiratorie con una carica virale elevatissima, equiparabile addirittura a quella riscontrabile a livello della cavità buccale, sosterebbero il principio di trasmissione per contiguità avanzata da Nash et al., (1972) e Ramsey et al.,(1982); tuttavia non si può escludere la possibile diretta localizzazione nelle basse vie respiratorie derivante dalla riattivazione di HSV1 latente a livello vagale, dato che tutti i pazienti considerati nello studio, sono immunodepressi. Da quanto esposto si evince che l'HSV1 presenta certamente una potenzialità patogena rilevante e sembra avere un ruolo primario nell'evoluzione di patologie respiratorie di pazienti critici. Nonostante la percentuale di HSV1 (19%) riscontrata nei casi da noi analizzati sia modesta, sembra importante sottolineare il reperimento del virus in campioni di BAL prelevati in corso di intubazione o dopo il 7^o giorno di

ventilazione assistita. La correlazione tra i due dati è statisticamente significativa ($\chi^2=4,43$, $P<0,05$), contrariamente a quanto si è evidenziato con gli altri virus erpetici. Un altro dato rilevante è l'elevato tasso di mortalità (77%) osservato nei soggetti in cui è stata riscontrata l'infezione erpetica da sola o in associazione con altri fattori di rischio, nonostante in alcuni casi sia stata applicata la terapia con aciclovir (55%). Il ruolo patogenetico di HSV1 in questo tipo di patologie non è ancora ben definito, ma l'associazione tra il reperimento di HSV1 nel paziente critico con l'elevato tasso di mortalità avvalorava l'ipotesi della riattivazione nel paziente immunodepresso che potrebbe determinare un quadro ingravescente di danno multi-organo, conducendo addirittura a morte il soggetto.

L'elevata prevalenza di mortalità può essere spiegata seguendo varie ipotesi: la prima prende spunto dallo studio condotto da Van de Bring et al. (2003) secondo cui il virus viene definito un "marker" di severità della patologia respiratoria piuttosto che il diretto responsabile dell'evoluzione fatale del soggetto malato; la seconda, dalla comparsa di eventuali ceppi resistenti al trattamento

antivirale; la terza, dall'applicazione tardiva del trattamento terapeutico con aciclovir. La terapia con aciclovir è certamente efficace, così come descritto in letteratura (Waugh et al. 2002; Biron et al., 2007), anche se il suo indiscriminato uso, anche a livello profilattico, sta portando, come detto prima, alla comparsa di numerosi ceppi resistenti sia nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo (10-18%; 2% in quello autologo e 19% in quello allogenico) sia in quelli che abbiano subito un trapianto d'organo solido (2-3%). La diagnosi di polmonite da HSV1, nei soggetti immunocompromessi e negli immunocompetenti, appare complessa in quanto nessun parametro clinico di diagnostica per immagini o di laboratorio di base è in grado di indirizzare chiaramente in tal senso la diagnosi. Malgrado ciò, l'indagine molecolare, accompagnata dall'isolamento del virus dopo qualche giorno di intubazione, non ha solo significato diagnostico per l'evidenziazione dell'infezione in corso, ma è, a nostro parere, estremamente più importante per la prevenzione dell'evoluzione fatale della patologia: l'osservazione della positività, infatti, non deve essere solo conoscitiva, ma deve indurre il clinico ad istaurare

una tempestiva e mirata terapia con la prospettiva di ridurre la gravità della malattia e l'alta percentuale di mortalità.

Per ottenere una diagnosi adeguata e significativa è indispensabile la stretta collaborazione tra il clinico ed il laboratorio. Comunque, in molti casi una diagnosi virologica rapida potrebbe costituire un elemento essenziale per la risoluzione di patologie erpetiche gravi di norma "clinicamente" non distinguibili, consentendo quindi l'instaurazione di un protocollo terapeutico specifico mirato onde ottenere il massimo beneficio.

In conclusione, si ritiene che una più frequente ed attenta valutazione dei rischi connessi all'infezione da virus erpetiche, in particolare da HSV₁, possa portare ad un decremento significativo del rischio di mortalità nei pazienti critici, specie se sottoposti a ventilazione assistita.

6. BIBLIOGRAFIA

- Armstrong JA, Pereira HG, Andrewes CH. Observations of the virus of infectious bovine rhinotracheitis and its affinity whit herpesvirus group. *Virology* 1961 ; 14 : 276 - 285.
- Astegiano S., Costa C., Terlizzi ME., Sidoti F., Gambarino S., Mantovani S., Solidoro P., Cavallo R., Bergallo M. *Intervirology* 2010; 53: 119-123
- BattersonW, Furlong D, Roizman B. Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Further characterization of a mutant defective in release of viral DNA and in other stages of viral reproductive cycle. *J Virol* 1983; 45: 397- 407.
- Biron K. 2007. Candidate anti-herpesviral drugs; mechanism of action and resistance, in *Human Herpesviruses* (eds. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski et al.), Cambridge University Press, Cambridge, pp.1218-50
- Bruynseels P, Jorens PG, Demey H. et al. Prospective study on the incidence of herpes simplex virus isolation in the

respiratory tract of critically ill patients: a prospective study.

Lancet 2003; 362: 1536-1541

➤ Buss DH, Scharyj M. Herpes virus infection of the esophagus and other visceral organs in adults: incidence and clinical significance. Am J Med 1979; 66: 457-462

➤ Byers RJ, Hasleton PS, Quigley A et al. Pulmonary herpes simplex in burns patients. Eur Respir J 9: 2313-2317, 1996

➤ Castleman B, Scully RE, McNeely BLL. Case records of the Massachusetts General Hospital (case 22). N Engl J Med 1973; 288: 1173-1180

➤ Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (second of two parts). N Engl J Med 1986; 314: 749-757

➤ Corey L. Herpes simplex virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds, Principles and practice of infectious diseases, 5th edn. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2000; 1564-1580

➤ De Vos N., Van Hoovels L., Vankeerberghen A., Boel A., Demeyer I., Creemers L and H. Monitoring of herpes simplex

virus in the lower respiratory tract of critically ill patients using real-time PCR: a prospective study. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 358- 363

➤ Falke D, Siegert R, Vogell W. Elektronenmikroskopische Befunde zur Frage der Doppelmembranbildung des Herpes - simplex - virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 1959 ; 9 : 484 - 496

➤ Furlong D, Swift H, Roizman B. Arrangement of herpes –virus deoxyribonucleic acid in the core. *J Virol* 1972 ; 10 : 1071 - 1074.

➤ Gibson W, Roizman B . Proteins specified by herpes simplex virus, VIII . Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2 . *J Virol* 1972 ; 10: 1044 - 1052.

➤ Graham BS, Snell JD. Herpes simplex virus infection of the adult lower respiratory tract. *Medicine* 1983; 62: 384-393

➤ Huff JL. And Barry PA. (2003); B-virus Cercopithecine herpes virus 1 infection in humans and

macaques: potential for zoonotic disease. *Emerging Infection Disease*, 9, 246-50

➤ Jenkins Fj, Roizman B. Herpes simplex virus recombinants with non-inverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. *J Virol* 1986;59:494-499.

➤ Kemble G. and Spaete R. (2007). Herpes simplex vaccines, in *human herpesviruses* (eds. A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski et al.), Cambridge University press, Cambridge, pp.1253-61

➤ Landini M.P. 1992. Il cytomegalovirus umano. Eds AMCLI. p. 42-43.

➤ Lungu O., Annunziato P.W., Gershon A. et al. (1995) Reactivated and latent varicella-zoster virus in human dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (24), 10980-84

➤ Mahalingam R., Wellish M., Cohrs R. et al. (1996) Expression of protein encoded by varicella-zoster virus open reading frame 63 in latently infected human ganglionic

neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (5), 2122-24

➤ Morgan HR, Finland M. Isolation of herpes virus from a case of atypical pneumonia and erythema multiforme exudativum: with studies of four additional case. *AM J Med Sci* 1949; 217: 92-95

➤ Nash G, Foley FD. Herpetic infection of the middle and lower respiratory tract. *Am J Clin Pathol* 1970; 54: 857-863

➤ Nash G. Necrotizing tracheobronchitis and bronchopneumonia consistent with herpetic infection. *Hum Pathol* 1972; 3: 283-291

➤ Nazerian K. DNA configuration in the core of Marek's disease virus . *J Virol* 1974 ; 13 : 1148 - 1150.

➤ Nesburn AB, Elliot JM, Leibowitz HM. Spontaneous reactivation of experimental herpes simplex keratitis in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1967 ; 78: 523 - 529.

➤ Omland LH., Vestergaard BF. And Vandall JH. 2008 Herpes simplex virus infections of the central nervous system:

a retrospective study of 49 patients. *Scandinavian journal of infection diseases*, 40, 59, 62

➤ Pack CK., CD Androuse BT. 2006 Immunity to herpes simplex virus: present but not perfect, in *alpha herpesviruses* (ed. RM. Sandri-Golding), *Molecular cell Biology* Caister Academic press, Wymondham, pp.434-360

➤ Ramsey PG, Fife KH, Hackman RC, Meyers JD, Corey L. Herpes simplex virus pneumonia: clinical, virological, and pathologic features in 20 patients. *Am Intern Med* 1982; 97: 813-820

➤ Roitzman B., Knipe DM. and Whitley RJ.. (2004); *Herpes Simplex Viruses*, in *Fields's Virology*, 5th edn, (eds DM. Knipe and PM. Howley), Lippincott Williams and Williams, New York, pp. 2502-601

➤ Roizman B and Furlong D. The replication of herpes viruses. In : Fraenkel-Conrat H, Wagner RR, eds *Comprehensive virology*, vol 3 New York : Plenum, 1974: 229 - 403

➤ Roizman B, Sears A. Inquiring into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu Rev Microbiol* ; 1987 ; 41 : 543.

➤ Roizman B. An inquiry into the mechanisms of recurrent herpes infections in man. In Pollard M , ed *Perspectives in virology IV*. New York : Harper & Row ; 1968 : 283.

➤ Rudolph S.A., Kuhn J.E., Korn, K., Braun R.W., Jahn, G. 1990. Prokaryotic expression of the major capsid protein of human cytomegalovirus and antigenic cross-reactions with herpes simplex virus. *Journal of Virology* 71:2023-2031.

➤ Sancho-Shimitzu V., Zhang SY., Abel L., et al. 2007 Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 7, 495-505

➤ Schuller D, Spessert C, Fraser VJ, Goodenberger DM. Herpes simplex virus from respiratory tract secretions: epidemiology, clinical characteristics, and outcome in immunocompromised and nonimmunocompromised hosts. *Am J Med* 1993; 94: 29-33

- Sherry MK, Klainer AS, Wolff M, Gerhard H. Herpetic tracheobronchitis. *Ann Intern Med* 1988; 109: 229-233
- Spruance ST, Overall JC Jr, Kern ER. The natural history of recurrent herpes simplex labialis - implications for antiviral therapy. *N Engl J Med* 1977; 297: 69 - 75
- Spruance ST, Crumacker CS, Schnipper LE, et al. Topical 10% acyclovir in polyethylene glycol for herpes simplex labialis : results of treatment begun in prodrome and erythema stages. Miami; 1982.
- Spruance ST, Crumacker CS. Topical 5% acyclovir in polyethylene glycol for herpes simplex labialis : antiviral effect without clinical benefit. *Am J Med* . 1982; 73 : 315.
- Stevens JC. Latent herpes simplex virus and the nervous system. *Curr Top Immunol* 1975; 70 : 31
- Tognon M, Furlong D, Conley AJ, Roizman B. Molecular genetics of herpes simplex virus. Characterization of a mutant defective in ability to form plaques at low temperatures and in a viral function which prevents

accumulation of coreless capsids at nuclear pores late in infection. *J Virol* 1981 ; 40 : 870 - 880.

➤ Tuxen DV, Cade JF, McDonald MI, Buchanan MRC, Clark RJ, Pain MCF. Herpes simplex virus from the lower respiratory tract in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respr Dis* 1982; 126: 416-419

➤ Valyi-Nagy T., Shukla D., Engelhard HH. Et al. 2007 Latency strategies of alphaherpesviruses: herpes simplex virus and varicella-zoster virus latency in neurons, in latency strategies of herpesviruses (eds J. Minarovits, E. Gonczol and T. ValyiNagi), Springer, New York, pp. 1-36

➤ Vernon SE. Herpetic tracheobronchitis: immunohistologic demonstration of herpes simplex virus antigen. *Hum Pathol* 13: 683-686, 1982

➤ Watzinger f, Ebner K, Lion T (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med* 27: 254-298

➤ Waugh SML., Pillay D., Carrington D. and Carman WF. (2002) Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy). *Journal of clinical virology*, 25: 241-66

- Whitley RJ, Roitzman B. Herpes simplex viruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds, Clinical Virology, 2nd edn. Washington, DC: ASM Press, 2002; 375-401

- Young SK, Rowe NH, Buchanan RA. A clinical study for the control of facial mucocutaneous herpes virus infections.I.Characterization of natural history in a professional school population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1976 ; 41 : 498.