

Maria Moriondo<sup>1</sup>, Francesco Nieddu<sup>1</sup>, Patrizia Pecile<sup>2</sup>, Federica Zoppi<sup>2</sup>, Tommaso Bondi<sup>1</sup>, Silvia Ricci<sup>1</sup>, Federica Ghiori<sup>1</sup>, Jessica Iacopelli<sup>1</sup>, Giulia Liccioli<sup>1</sup>, Chiara Azzari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servizio di Immunologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria Internistica, Azienda Ospedaliero-Universitaria "A. Meyer" - Università di Firenze; <sup>2</sup> Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze

## Le infezioni pneumococciche dell'adulto in Italia e la possibilità di prevenzione

### Quale ruolo per i nuovi vaccini coniugati?

#### Introduzione

*Streptococcus pneumoniae* o pneumococco è un batterio diplococco gram-positivo che rappresenta una delle maggiori cause di mortalità e morbilità in tutto il mondo. È raggruppato in oltre 90 differenti sierotipi sulla base delle caratteristiche chimiche e sierologiche dei polisaccaridi che costituiscono la sua capsula batterica. Degli oltre 90 sierotipi, circa 30-40 sono in grado di procurare infezioni nell'uomo e, tra questi, 15 sierotipi da soli causano l'80% delle infezioni pneumococciche invasive (IPD) nel mondo<sup>1,2</sup>. Lo pneumococco è normalmente presente nel faringe dei soggetti sani (dal 20 fino al 60% nel periodo autunno invernale) ed è comunemente responsabile di infezioni non invasive come la sinusite paranasale o l'otite media, e di patologie invasive (*invasive pneumococcal disease*, IPD) come meningite, batteriemia, polmonite e/o empiema.

Le fasce di popolazione che presentano un rischio di infezione più elevato per le IPD sono quella pediatrica, particolarmente i bambini minori di 2 anni e quella anziana, principalmente i maggiori di 65 anni. Sono considerati ad alto rischio anche i malati cronici di patologie respiratorie e polmonari (compresi gli asmatici), i cardiopatici, i diabetici, gli alcolisti; ma anche gli individui immunosoppressi, i pazienti trapiantati di midollo osseo, i pazienti affetti da patologie renali ed epatiche.

Negli Stati Uniti nel solo anno 2009 lo pneumococco ha causato 14,3 casi di IPD ogni

100.000 abitanti, raggiungendo 38,7 casi ogni 100.000 abitanti nella fascia di età maggiore di 65 anni<sup>3,4</sup>. Per quanto riguarda l'Europa i dati epidemiologici mostrano una situazione eterogenea, nella quale il numero di IPD riportate nell'anno 2006 in 18 Paesi dell'UE varia da 0,4 a 20 per 100.000 abitanti<sup>5</sup>. La differenza di incidenza è in gran parte dovuta alla diversa attitudine a ricercare l'agente eziologico nelle malattie batteriche dell'anziano e alle diverse possibilità diagnostiche presenti nei laboratori dei vari stati europei.

Benché le IPD possano essere trattate con efficacia con gli antibiotici, un eccessivo utilizzo di questi farmaci può portare alla diffusione di ceppi resistenti. Questo preoccupante fenomeno è in continua crescita<sup>6</sup>, seppure non in modo omogeneo, in tutti i paesi industrializzati. Le IPD sono prevenibili attraverso la vaccinazione, pertanto questa rappresenta una delle principali strategie per la protezione, assieme al costante miglioramento delle modalità di intervento e del trattamento dei pazienti.

Per gli anziani e i pazienti affetti dalle patologie citate precedentemente, nella quasi totalità dei Paesi industrializzati, inclusa l'Italia, è stato fino ad oggi utilizzato il vaccino anti-pneumococcico polisaccaridico 23 valente (PPV23), in commercio dal 1983<sup>7</sup>.

Sebbene presenti una copertura potenziale elevata visto l'alto numero di sierotipi inclusi nel vaccino, la risposta immunitaria indotta dal vaccino è scarsa. La risposta

anti-polisaccaride, infatti, è una risposta di tipo T indipendente e quindi il PPV23 non induce memoria immunologica né immunità mucosale. L'efficacia del PPV23 è stata messa particolarmente in dubbio proprio nella popolazione anziana e negli adulti a rischio, ovvero i target principali del vaccino<sup>8</sup>. Quand'anche fosse indotta, l'efficacia protettiva del PPV23 si riduce entro tre anni dalla vaccinazione<sup>9</sup>, è minore nei soggetti più anziani e in presenza di altre patologie<sup>8-11</sup>. In questi ultimi casi la risposta anticorpale può dimostrarsi addirittura nulla<sup>8,12,13</sup>.

Le criticità del PPV23 sono state superate con la messa a punto di vaccini anti-pneumococcici coniugati (PCV). La risposta immunitaria indotta dai PCV è di tipo T dipendente, determina quindi una memoria immunologica a lungo termine, che può durare tutta la vita<sup>14,15</sup> ed è efficace sia nei bambini sotto i 2 anni che negli adulti e anziani. Il PCV-7, primo a entrare nell'uso in età pediatrica, si è mostrato efficace nel ridurre l'incidenza dei sierotipi vaccinali nelle malattie pneumococciche invasive nei bambini e negli adulti immunizzati<sup>15</sup>.

Recentemente, proprio per ottenere protezione contro un numero sempre più elevato di sierotipi è stato messo in commercio un vaccino coniugato 13 valente (PCV13). In Italia il vaccino viene somministrato a tutti i nuovi nati nel primo anno di vita ed è utilizzabile negli adulti al di sopra dei 50 anni di età<sup>16,17</sup>.

Nel nostro studio abbiamo valutato la poten-

ziale protezione da malattie pneumococciche invasive (sepsi o meningite) ottenibile con i vaccini pneumococcici coniugati altamente immunogeni in una popolazione di adulti italiani.

## Pazienti e metodi

Il presente studio comprende 88 pazienti italiani adulti di età compresa tra 16 e 100 anni e con diagnosi confermata di IPD.

La diagnosi di sospetta IPD è stata formulata dai medici in caso di sospetto clinico di malattia batterica (polmonite, meningite o sepsi). L'IPD è stata considerata confermata quando lo *S. pneumoniae* è stato individuato in liquidi biologici normalmente sterili (come sangue, liquor o liquido pleurico) con metodi microbiologici colturali standard o con metodi molecolari (Real-time PCR) indirizzati alla ricerca del gene batterico della autolisina-A (lytA)<sup>18</sup>. Sono stati esclusi dallo studio i pazienti con almeno un ricovero ospedaliero nei 15 giorni precedenti alla infezione. Per il trattamento dei dati sensibili è stato ottenuto il consenso del comitato etico.

## Trattamento dei campioni

Gli ospedali aderenti al progetto hanno spedito il campione prelevato (entro 24 ore dal prelievo) dei pazienti con diagnosi di sospetta IPD al laboratorio centrale (AOU Anna Meyer, Firenze) tramite un corriere postale. I test molecolari sono stati eseguiti nelle 2 ore successive al ricevimento del campione. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da 200 µL di materiale biologico. Il DNA estratto è stato utilizzato sia per la conferma di IPD che per la sierotipizzazione.

## Diagnosi e sierotipizzazione di IPD

La diagnosi di conferma di IPD è stata effettuata mediante Real Time PCR utilizzando una sonda costruita sul gene batterico lyt-A. La sierotipizzazione è avvenuta mediante tecnica RT-PCR utilizzando primer e sonde specifiche per i 29 sierotipi più frequenti<sup>18</sup>. I primer sono stati costruiti nella regione CPS.

I campioni positivi che non sono risultati appartenenti a nessuno dei sierotipi testati sono stati amplificati e sequenziati. I campioni positivi per lytA e negativi per entrambi i test di sierotipizzazione sono stati considerati

non tipizzabili. I sierotipi sono stati classificati come PCV7 se inclusi nel vaccino 7 valente, PCV10 se inclusi nel vaccino 10 valente e PCV13 se inclusi nel vaccino 13 valente.

## Analisi statistica dei dati

I risultati sono stati espressi come media e deviazione standard o, quando appropriato, come mediana e range interquartile. Le analisi sono state effettuate con il software SPSSX. Sono stati considerati come statisticamente significativi i risultati con valore p (p-value) < 0,05.

## Risultati

### Diagnosi di IPD

Abbiamo identificato un totale di 88 pazienti con IPD provenienti da 10 regioni italiane. 48 maschi 40 femmine rapporto M/F 1.2 età mediana 65,9, range IQ 45,0-74,5. La distribuzione per età è dimostrata in Figura 1. Come atteso la più elevata frequenza di casi e quindi il maggior rischio di IPD è presente nelle classi di età più avanzate; un picco di elevata frequenza è però evidente anche nei pazienti di età compresa tra 35 e 45 anni. Degli 88 campioni disponibili, 29 campioni sono stati testati contemporaneamente con metodi

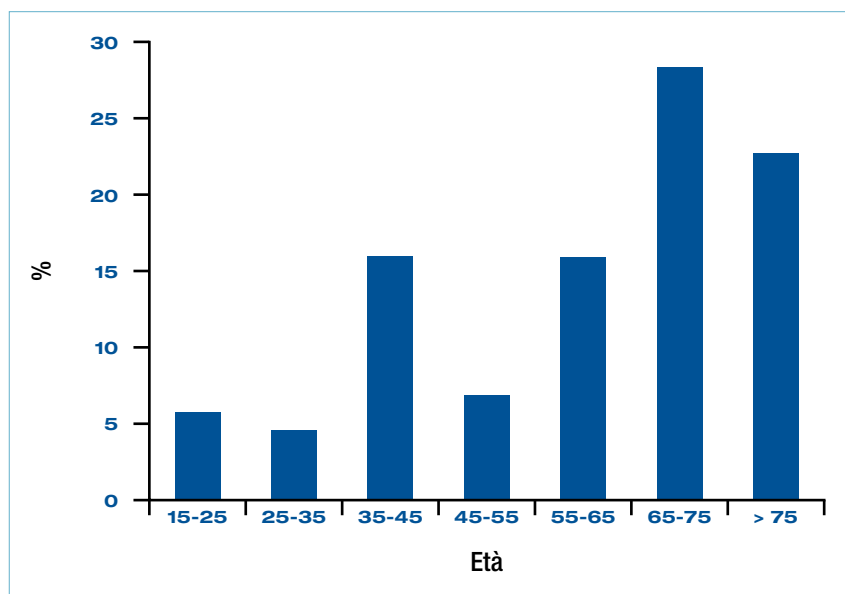
molecolari (Real-time PCR) e con metodi microbiologici standard (coltura): di questi 12/29 (41%) sono risultati positivi anche alla coltura mentre tutti, 100%, erano positivi con Real-time PCR. I metodi molecolari si sono dimostrati 2,4 volte più sensibili dei metodi colturali. Nei campioni positivi per *S. pneumoniae* in RT-PCR, analizzati contemporaneamente anche con metodi colturali, non sono stati individuati altri batteri.

### Distribuzione dei sierotipi

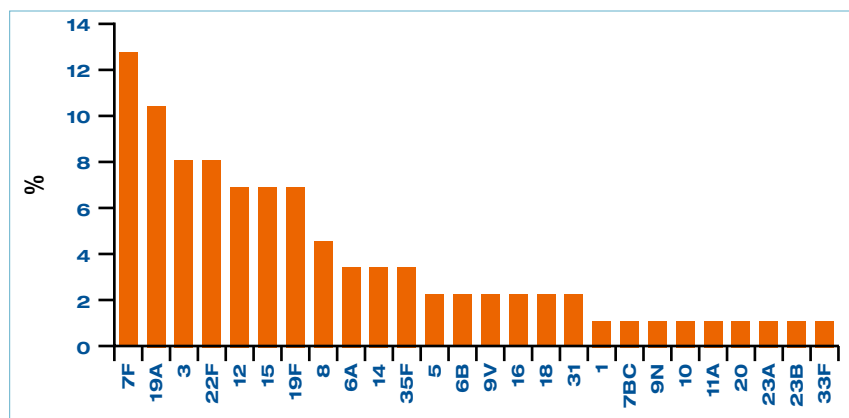
Sono stati sierotipizzati 86/88 (98%) campioni. I 2 campioni non tipizzati sono risultati tali a causa della quantità insufficiente di campione.

I sierotipi più rappresentati risultano il 7F (11/86, 12,8%) seguito dal 19A (9/86, 10,5%), e dai sierotipi 22F e 3 (ciascuno 7/86, 8,1%). A seguire i sierotipi 12, 15 e 19F (ciascuno 6/86, 7,0%). I restanti sierotipi sono mostrati nella Figura 2. La protezione potenziale ottenibile con PCV7 è risultata essere del 17,4% (15/86). La protezione potenziale del PCV10 è risultata essere del 38% (33/86). La protezione potenziale ottenibile con PCV 13V è risultata del 56% (48/86). Dividendo i pazienti in fasce di età (gruppo 1: 16-35 anni, gruppo 2 35-50 anni, gruppo 3 50-70 anni, gruppo 4 > 70 anni), si nota che la potenziale protezione ottenibile con il PCV13

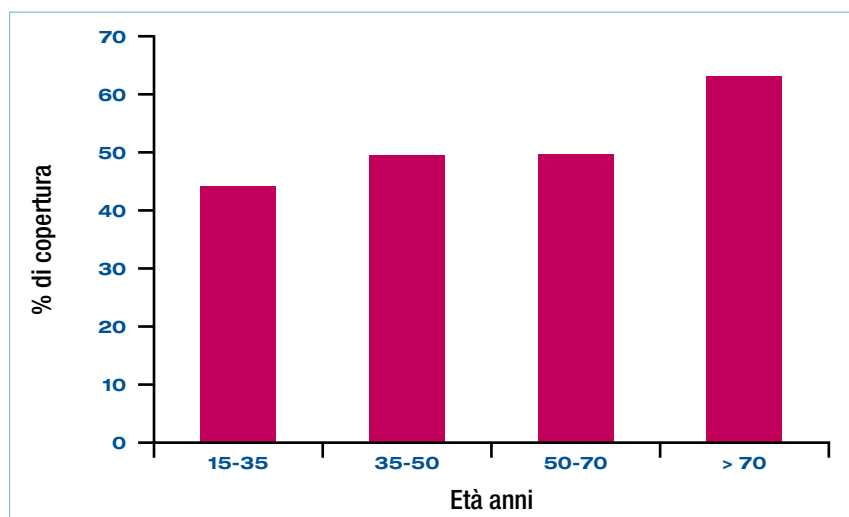
FIGURA 1.  
Distribuzione per età



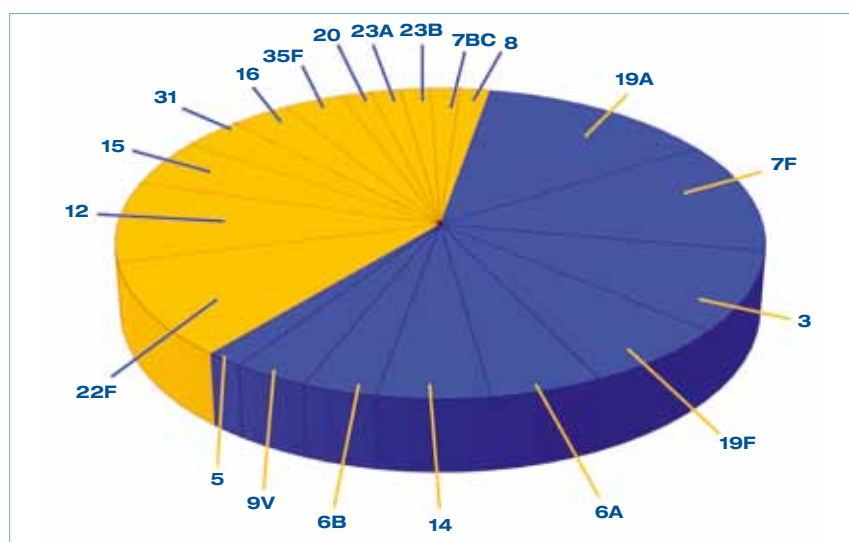
**FIGURA 2.**  
Sierotipi più rappresentati



**FIGURA 3.**  
Potenziale protezione ottenibile con il PCV13



**FIGURA 4.**  
Sierotipi presenti nell'età adulta



(Fig. 3) aumenta progressivamente con l'età, essendo del 50% in pazienti tra 50 e 70% e 63,6% nei pazienti oltre i 70 anni.

Nel complesso, visti i sierotipi presenti nell'età adulta (Fig. 4), il PCV13 appare in grado di prevenire, in pazienti di età superiore a 16 anni, oltre il 50% delle infezioni pneumococche invasive.

## Discussione

La conoscenza dei sierotipi attualmente circolanti è essenziale per una corretta valutazione della potenziale copertura dei vaccini attualmente commercializzati così come la messa a punto di una efficace strategia vaccinale necessita di una sorveglianza specifica per aree geografiche e per fasce di età.

La nostra ricerca ha confermato la maggiore sensibilità delle tecniche molecolari rispetto alle tecniche colturali. La Real-time PCR è risultata più sensibile di circa 2,4 volte rispetto alla coltura batterica, dato che conferma studi simili pubblicati recentemente<sup>19</sup>. I nostri dati dimostrano una forte presenza del sierotipo 19A che risulta essere il secondo sierotipo più rappresentato, subito dopo il 7F, superando il 10% del totale. Questo dato, emerso anche nella popolazione pediatrica italiana e in popolazioni di adulti e bambini in altri paesi del mondo, risulta essere di notevole importanza vista la frequente antibiotico-resistenza associata a questo sierotipo.

La potenziale copertura aumenta sensibilmente passando dal PCV7 al PCV13. Il PCV7 ha una potenziale protezione inferiore al 20%. Al contrario i sierotipi inclusi nel 13 valente sarebbero in grado di prevenire oltre la metà dei casi che si verificano in tutti gli adulti e ancora di più (circa 2/3) se si considera la popolazione più anziana. I nostri dati infatti dimostrano che la copertura ottenibile con il vaccino 13 valente aumenta con l'età ed è tanto più elevata proprio nelle categorie a maggior rischio, quelle degli adulti di età superiore a 50 anni e degli anziani.

La bassa copertura del PCV7, presente in tutte le fasce di età potrebbe essere sensibilmente diminuita a partire dall'introduzione del vaccino. Un fenomeno simile, correlato allo shift sierotipico, è già stato osservato nella popolazione italiana pediatrica. Questo fenomeno potrebbe essere determinato dall'introduzione del vaccino 7 valente

avvenuta in Italia più di dieci anni fa per la fascia pediatrica. Lo shift sierotipico che ne è derivato potrebbe essersi verificato anche nella popolazione anziana, spesso strettamente a contatto con quella pediatrica (ad esempio nonni e nipoti) grazie al fenomeno dell'immunità di gregge già riscontrato in numerosi lavori. Occorre evidenziare che lo shift potrebbe essere causato anche da un trend secolare, con cambiamenti sierotipici che si verificano indipendentemente dalla introduzione dei vaccini.

È evidente che nel futuro la protezione antipneumococcica potrà essere migliorata includendo nel vaccino coniugato anche altri sierotipi che nel presente studio risultano emergere (ad esempio il 22, il 12 e il 15) e che una continua sorveglianza delle infezioni pneumococciche e dei sierotipi implicati è assolutamente necessaria.

## Conclusioni

La mortalità e la morbilità delle IPD devono essere combattute con metodiche che non si basino esclusivamente sull'utilizzo degli antibiotici: sappiamo come un uso massivo porta alla selezione e diffusione di ceppi resistenti. Questo sta avvenendo anche attualmente ed è dato come un fenomeno preoccupante e in crescita. Dunque una strategia vincente contro le IPD difficilmente può prescindere da una corretta strategia vaccinale e questo vale per i bambini come per gli adulti. Come dimostrato per la fascia di età pediatrica, la vaccinazione può rappresentare un'efficace pratica sanitaria che consente un effettivo risparmio e un vantaggioso rapporto tra costo e beneficio. L'utilizzo del vaccino polisaccaridico 23 valente è progressivamente sempre più limitato viste le perplessità che sempre maggiormente vengono poste sulla sua reale efficacia e sulla durata della protezione negli adulti e in particolare negli anziani e negli immunocompromessi. I vaccini coniugati (PCV) si sono dimostrati più immunogeni e più efficaci in tutte le classi di età e nelle categorie a rischio. Tra i vaccini PCV sicuramente il nuovo PCV13 garantisce una maggiore copertura per quanto riguarda adulti e anziani, anche se minore rispetto a quella garantita per la fascia pediatrica. L'autorizzazione della FDA, concessa alla fine del 2011, all'utilizzo del PCV13 nella popolazione adulta con più

di 50 anni segna una tappa fondamentale per la sua diffusione. Lo sviluppo futuro di altri vaccini coniugati contenenti ulteriori sierotipi rappresenta una prospettiva opportuna, particolarmente per la popolazione anziana, ma non può prescindere dal proseguimento di un costante e continuo monitoraggio e della sorveglianza sierotipica condotta con le tecniche che garantiscono una maggiore sensibilità, che al momento risultano essere quelle di biologia molecolare e in particolare la Real-time PCR.

Resta ancora da chiarire se il PPV23 possa continuare a svolgere un ruolo nelle strategie vaccinali per la popolazione adulta, ovvero se, dopo una dose di vaccino coniugato, possa essere utile somministrare anche una dose di vaccino polisaccaridico 23 valente. È possibile infatti che il vaccino polisaccaridico inibisca addirittura la risposta al coniugato 13 valente; per questo motivo, qualora si decidesse di somministrare il vaccino 23 valente in aggiunta al coniugato, il coniugato dovrà essere sempre somministrato per primo.

## Bibliografia

- 1 Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, et al. *Streptococcus pneumoniae: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention*. Pharmacotherapy 2005;25:1193-212.
- 2 Shouval DS, Greenberg D, Givon-Lavi N, et al. *Site-specific disease potential of individual Streptococcus pneumoniae serotypes in pediatric invasive disease, acute otitis media and acute conjunctivitis*. Pediatr Infect Dis J 2006;25:602-7.
- 3 Centers for Disease Control and Prevention. *ABCs Report: Streptococcus pneumoniae, 2009*. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs): Emerging Infections Program Network. <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/sur-reports/spneu09.html>
- 4 Overman MC. *Time for changes in pneumococcal vaccination of adults?* J Am Osteopath Assoc 2011;111(10 Suppl 6):S19-22.
- 5 Durando P, Sticchi C, Compagnino F, et al. *Heptavalent Pneumococcal Conjugate Vaccine: growing knowledge and its implications for Italy*. J Prev Med Hyg 2008;49:34-46.
- 6 Gertz RE Jr, Li Z, Pimenta FC, et al.; Active Bacterial Core Surveillance Team. *Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era*. J Infect Dis 2010;201:770-5.
- 7 Centers for Disease Control and Prevention; Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J, editors. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. 2<sup>nd</sup> edn. Washington, DC: Public Health Foundation 2011.
- 8 *23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine*. WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2008;83:373-84.
- 9 Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, et al. *The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine*. N Engl J Med 1991;325:1453-60.
- 10 Schenkein JG, Nahm MH, Dransfield MT. *Pneumococcal vaccination for patients with COPD: current practice and future directions*. Chest. 2008;133:767-74.
- 11 Rahier JF, Moutschen M, Van Gompel A, et al. *Vaccinations in patients with immune-mediated inflammatory diseases*. Rheumatology 2010;49:1815-27.
- 12 Rodriguez-Barradas MC, Groover JE, Lacke CE, et al. *IgG antibody to pneumococcal capsular polysaccharide in human immunodeficiency virus-infected subjects: persistence of antibody in responders, revaccination in nonresponders, and relationship of immunoglobulin allotype to response*. J Infect Dis 1996;173:1347-53.
- 13 Benin AL, O'Brien KL, Watt JP, et al. *Effectiveness of the 23-valent polysaccharide vaccine against invasive pneumococcal disease in Navajo adults*. J Infect Dis. 2003;188:81-9.
- 14 Pletz MW, Maus U, Krug N, et al. *Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species*. Int J Antimicrob Agents 2008;32:199-206.
- 15 WHO. *Changing epidemiology of pneumococcal serotypes after introduction of conjugate vaccine: July 2010 report*. Wkly Epidemiol Rec 2010;85:434-6.
- 16 Schwarz TF, Flamaing J, Rümke HC, et al. *A randomized, double-blind trial to evaluate immunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine given concomitantly with trivalent influenza vaccine in adults aged ≥ 65 years*. Vaccine 2011;29:5195-202.
- 17 Hampton LM, Farley MM, Schaffner W, et al. *Prevention of antibiotic-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae with conjugate vaccines*. J Infect Dis. 2012;205:401-11.
- 18 Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, et al. *Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease*. PLoS One 2010;5:e9282.
- 19 Resti M, Moriondo M, Cortimiglia M, et al.; Italian Group for the Study of Invasive Pneumococcal Disease. *Community-acquired bacteremic pneumococcal pneumonia in children: diagnosis and serotyping by real-time polymerase chain reaction using blood samples*. Clin Infect Dis 2010;51:1042-9.