

Riacutizzazione di bronchite cronica e biofilm

Acute bacterial exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and biofilm

Delfino Legnani

Istituto di Malattie Respiratorie, Università di Milano, U.O.C. Pneumologia, Ospedale "L. Sacco", Milano, Italy

Le basse vie aeree dei pazienti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) sono frequentemente colonizzate da germi patogeni, quali *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae*. Il ruolo che la colonizzazione batterica delle grandi e piccole vie aeree esplica in tali pazienti non è del tutto chiarito.

Gli ultimi venti anni sono stati quelli decisivi per la comprensione della patogenesi delle infezioni.

Le nuove tecniche molecolari, cellulari e immunologiche, utilizzate per studiare l'interazione ospite-patogeno, sono state applicate per riesaminare il ruolo che l'infezione gioca nella BPCO: vi è oggi una nuova e considerevole evidenza che sia un'infezione la causa predominante delle riacutizzazioni, ed è verosimile che sia implicata anche nella patogenesi stessa della BPCO o quantomeno contribuisca alla sua evoluzione.

Il ruolo dei vari microrganismi, batteri, virus e atipici, è però diverso, sia in funzione della specie di appartenenza del microrganismo che della fase della patologia, stabile o riacutizzata, e comunque non sempre chiaro e ben definito. Se, quindi, nelle riacutizzazioni sono spesso presenti *Haemophilus influenzae* (20-30%), *Streptococcus pneumoniae* (10-15%), *Moraxella catarrhalis* (10-15%) e *Pseudomonas aeruginosa* (5-10%, soprattutto nella fase avanzata della malattia), nella condizione stabile di malattia il ruolo maggiore viene svolto solo da emofilo, e solo in misura minore da pneumococco, moraxella e pseudomonas. Il ruolo di altre specie patogene è a tutt'oggi poco chiaro. Uno schema dei principali microrganismi coinvolti nella BPCO, e nella sua riacutizzazione, è riportato in Tabella 1 [1].

Meccanismi della riacutizzazione di bronchite cronica

In merito alla patogenesi della BPCO, esiste oggi una nuova e considerevole evidenza che avvalorata l'ipotesi di un "circolo vizioso", secondo la quale un'infezione respiratoria cronica è un processo di risposta infiammatoria stimolato, in qualche misura, da un batterio e mediata dall'ospite.

Nei pazienti che vanno incontro ad infezioni ripetute, si determina un decorso progressivo, a spirale, che si perpetua e contribuisce alla progressione della malattia [1].

A sostegno di tale ipotesi, un'analisi *pooled*, fondata sui risultati degli esami colturali condotti in corso di fibrobroncoscopia mediante PBS (*protected specimen brush*) ha messo in evidenza, in soggetti adulti, una presenza di batteri nelle vie respiratorie, in concentrazioni clinicamente significative, nel 4% dei soggetti sani, nel 29% dei soggetti con BPCO stabile e nel 54% dei soggetti con riacutizzazione di BPCO [1].

L'ipotesi finora invalsa proponeva che le riacutizzazioni batteriche di BPCO fossero solo il risultato di un aumento della concentrazione batterica (carica batterica) di un'infezione cronica latente. Tuttavia, un'analisi esaustiva della relazione tra concentrazione batterica nell'espettorato, acquisizione di un nuovo patogeno e sintomatologia clinica ha evidenziato che è poco probabile che una variazione della carica batterica costituisca un meccanismo indipendente di riacutizzazione. È vero, piuttosto, che le infezioni batteriche delle basse vie respiratorie rappresentano un processo dinamico e complesso e che l'acquisizione di nuovi ceppi batterici gioca un ruolo chiave nella patogenesi delle riacutizzazioni.

Tabella 1 - Microrganismi implicati nella BPCO.

| <i>Microrganismo</i> | <i>Ruolo nella riacutizzazione</i> | <i>Ruolo nella malattia in fase stabile</i> |
|---------------------------------|--|---|
| Batteri | | |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 20-30% di tutte le riacutizzazioni | Ruolo maggiore |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 10-15% di tutte le riacutizzazioni | Ruolo minore |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | 10-15% di tutte le riacutizzazioni | Ruolo minore |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5-10% di tutte le riacutizzazioni | Probabilmente importante nella fase avanzata di malattia |
| Enterobacteriaceae | Isolati nella fase avanzata della malattia, significatività patogena non accertata | Non definito |
| <i>H. haemolyticus</i> | Isolamento frequente, causa improbabile | Improbabile |
| <i>H. parainfluenzae</i> | Isolamento frequente, causa improbabile | Improbabile |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Isolamento poco frequente, causa improbabile | Improbabile |
| Virus | | |
| Rhinovirus | 20-25% di tutte le riacutizzazioni | Improbabile |
| Virus parainfluenzae | 5-10% di tutte le riacutizzazioni | Improbabile |
| Virus influenzae | 5-10% di tutte le riacutizzazioni | Improbabile |
| Virus respiratorio sinciziale | 5-10% di tutte le riacutizzazioni | Controverso |
| Coronavirus | 5-10% di tutte le riacutizzazioni | Improbabile |
| Adenovirus | 3-5% di tutte le riacutizzazioni | Si osserva un'infezione latente, significatività patogena non accertata |
| Metapneumovirus umano | 3-5% di tutte le riacutizzazioni | Improbabile |
| Batteri atipici | | |
| <i>Chlamidophila pneumoniae</i> | 3-5% di tutte le riacutizzazioni | Isolamento frequente, significatività patogena non accertata |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> | 1-2% di tutte le riacutizzazioni | Improbabile |
| Funghi | | |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | Non definito | Isolamento frequente, significatività patogena non accertata |

L'acquisizione di un nuovo ceppo batterico - *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* o anche *P. aeruginosa* - è fortemente correlato con il verificarsi della riacutizzazione. La sequenza di eventi che si realizza in tale circostanza è descritta in Figura 1 [1]. È inoltre emersa un'evidenza anatomo-patologica dell'infezione cronica nella BPCO.

Allorché l'ostruzione associata alla BPCO inizia a peggiorare, nelle piccole vie aeree si evidenziano follicoli linfoidi ricchi di linfociti B la cui presenza rappresenta, verosimilmente, una risposta tessutale all'infezione locale cronica. Immagini ottenute con la TAC ad alta risoluzione mostrano che bronchiectasie di lieve entità siano un evento comune della BPCO in fase avan-

zata. L'infezione cronica costituisce un altro importante mediatore dell'infiammazione della fibrosi cistica e delle bronchiectasie. Queste diverse osservazioni avvalorano l'ipotesi secondo cui l'infezione prolungata, di bassa entità, nella BPCO possa peggiorare la malattia, probabilmente danneggiando le vie aeree e determinando l'insorgenza di bronchiectasia.

È dunque probabile che l'ipotesi del circolo vizioso corrisponda al vero, ma quali i meccanismi ad essa sottesi? In seguito ad un insulto iniziale, quale ad esempio fumo di tabacco, esposizione professionale ad agenti irritativi, che altera i meccanismi di difesa polmonare innati, viene consentita una colonizzazione microbica che a sua volta perpetua una sequenza clinica

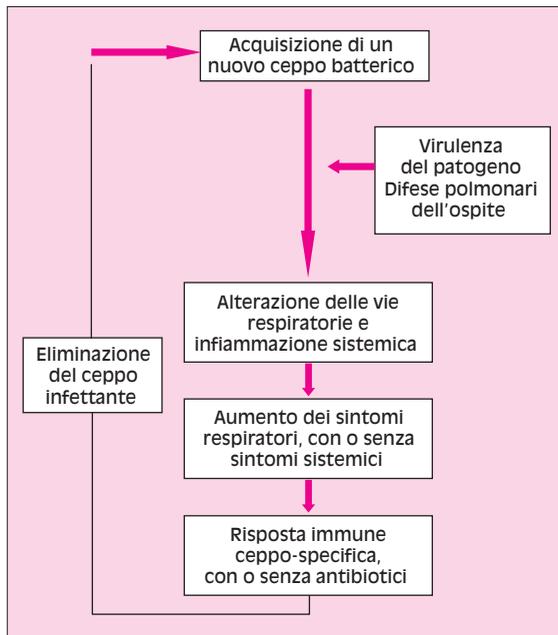


Figura 1 - Modello della patogenesi di riacutizzazioni batterica nella BPCO.

di eventi che contribuisce a “sostenere” l’infiammazione persistente e l’infezione, caratteristiche della BPCO, stabilendo appunto quello che, secondo l’opinione di molti, viene ritenuto un “circolo vizioso” (Figura 2) [2].

H. influenzae e *P. aeruginosa*, che nella BPCO rappresentano i batteri patogeni prevalenti (quest’ultimo solo nelle fasi più avanzate), aumentano la secrezione di muco, alterando profondamente la normale attività ciliare e danneggiando l’epitelio respiratorio, un elemento che a sua volta altera, in misura ancora maggiore, la clearance mucociliare.

Tuttavia, l’evidenza definitiva che la progressione della BPCO sia la conseguenza di un’infiammazione prodotta da una infezione è ancora assente. Una tappa importante di cui tener conto è che alla colonizzazione batterica, sostenuta da un microrganismo diverso. I risultati degli esami colturali di routine, effettuati su campioni di espettorato o di lavaggio bronco-alveolare, possono sottostimare, anche in maniera consistente, l’incidenza dell’infezione cronica nella BPCO. Tecniche di rilevamento diverse dall’esame microbiologico standard hanno identificato la presenza di *H. influenzae* nel lume delle vie aeree (in campioni di espettorato), nell’epitelio bronchiale e all’interno dei macrofagi sub-epiteliali.

Questo microrganismo può, attraversando l’epitelio bronchiale, raggiungere la sottomucosa e le cellule alveolari interstiziali, inaccessibili agli antibiotici e quindi protette dalla loro attività battericida [1].

In uno studio volto a chiarire il ruolo etiologico di batteri patogeni isolati dall’esame colturale di espettorato nel corso delle riacutizzazioni di BPCO, gli autori hanno osservato come alle riacutizzazioni da *H. influenzae* e *M. catarrhalis* fosse associato un aumento dell’infiammazione delle vie respiratorie [riscontro dei fattori di infiammazione interleuchina (IL)-8, TNF (*tumor necrosis factor*)-alfa ed elastasi neutrofila], un dato che avvalora l’ipotesi di un ruolo etiologico di questi patogeni [3]. Nell’etiologia delle riacutizzazioni della BPCO sono coinvolti microrganismi diversi, come evidenziato in uno studio di Eller et al. che correla la gravità dell’ostruzione bronchiale a specifici patogeni. In particolare, nel III stadio, è *Pseudomonas aeru-*

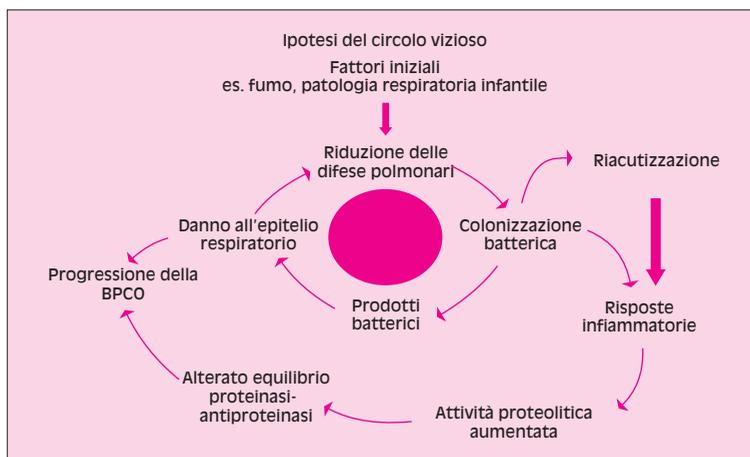


Figura 2 - Ipotesi del “circolo vizioso”.

ginosa il microrganismo riscontrato con maggiore frequenza [4].

BPCO e fibrosi cistica

P. aeruginosa è coinvolto anche, e soprattutto, nell'etiologia dell'infezione polmonare cronica che si riscontra nella fibrosi cistica [5]. Si tratta di un biofilm caratterizzato da elementi caratteristici, di seguito elencati:

- fenotipo mucoide con abbondante produzione di alginato, rilevato sia *in vitro* che nei pazienti
- microcolonie circondate da alginato (osservazione nell'espettorato e nelle indagini *post-mortem*)
- i batteri risiedono all'interno del muco e crescono in condizioni di anaerobiosi utilizzando, quale accettore di elettroni, il nitrato
- i batteri non sono localizzati sulle cellule epiteliali, ma inducono una endobronchiolite senza diffondersi al circolo ematico o ad altri organi
- elevati livelli di anticorpi diretti contro l'alginato e altri antigeni di *P. aeruginosa*
- resistenza nei confronti dei meccanismi di difesa del paziente e del trattamento antibiotico.

Tuttavia, alla documentazione della formazione di biofilm da parte di *P. aeruginosa in vitro* non fa riscontro, a tutt'oggi, una pari documentazione *in vivo*.

I radicali dell'ossigeno prodotti dalla risposta infiammatoria dei leucociti polimorfonucleati inducono delle mutazioni responsabili della produzione di alginato, tanto caratteristica della infezione da biofilm da *P. aeruginosa* nella fibrosi cistica.

Nella formazione, *in vitro* e *in vivo*, del biofilm maturo è implicato anche il fenomeno del *quorum sensing*. La modalità di crescita del biofilm rappresenta la strategia di sopravvivenza di batteri ambientali quale *P. aeruginosa*; inoltre, i biofilm sono anche protetti dall'azione degli antibiotici e dalla risposta immune nei polmoni del paziente. Il danno tessutale è ascrivibile all'infiammazione, mediata da immunocomplessi, dei PMN che determina il rilascio di proteasi leucocitarie [5].

Si è allora individuato una sorta di parallelismo, per quanto attiene all'aspetto infettivologico, tra fibrosi cistica e BPCO, come riportato da Martinez-Solano et al.: "... gli elementi implicati nell'infezione da *P. aeruginosa* nella loro coorte di pazienti con BPCO sono simili a quelli riportati

in pazienti affetti da fibrosi cistica. In primo luogo, un singolo clone infetta ciascun paziente e non vi è alcuna evidenza di una trasmissione interpaziente di cloni epidemici. In secondo luogo, si nota un trend, nei ceppi implicati nelle infezioni croniche di BPCO, verso un aumento del tasso di mutazioni e di resistenza antibiotica, mentre la citotossicità e la motilità, al pari dei livelli di espressione della piocianina e delle proteasi diminuiscono, una caratteristica che potrebbe promuovere la sopravvivenza a lungo termine nei polmoni dei pazienti affetti da fibrosi cistica. I ceppi isolati dal polmone, dove essi crescono attaccati alle superfici, tendono a produrre quantità più elevate di biofilm rispetto a quelli riscontrati isolati da emocoltura. Benché i ceppi isolati da uno stesso paziente appartengano ad uno stesso clone, sono stati osservati morfotipi diversi, al pari di fluttuazioni nel profilo di sensibilità agli antibiotici..." (6). Poste queste premesse, si è indotti a elaborare qualche considerazione: nella gestione della fibrosi cistica, la terapia antibiotica eseguita correttamente, per quanto attiene a scelta dell'antibiotico, della via di somministrazione e della posologia, ha condizionato positivamente la vita e la sopravvivenza dei pazienti. Quindi, se alla BPCO fosse applicato un approccio terapeutico simile a quello praticato per la fibrosi cistica, è probabile che si possano ottenere, in futuro, migliori risultati anche per questa patologia respiratoria.

Biofilm

Rimane ancora un'ipotesi in attesa di conferma quella che la resistenza alla terapia antibiotica o la persistenza di questi microrganismi a livello interstiziale e sottomucoso sia da attribuire, tra gli altri fattori, anche alla presenza del biofilm. Per quanto attiene a *H. influenzae*, ad esempio, Murphy e Kirkham concludono, in un articolo incentrato sulla formazione di biofilm da parte di ceppi di *H. influenzae* non tipizzabili (NTHI, *nontypeable Haemophilus influenzae*) che *in vitro* la formazione di biofilm avviene sicuramente [7]. In questo studio, i ceppi isolati da campioni clinici mostravano una considerevole variabilità per quanto attiene alla capacità di crescere come biofilm, in funzione dell'espressione di tre proteine principali di membrana (P2, P5 e P6); i pili rivestivano un ruolo importante nella formazione del biofilm.

Gli autori affermano che, divenendo sempre meglio definito il ruolo del biofilm nelle infezioni umane, la caratterizzazione dei biofilm può

essere importante al fine della comprensione della patogenesi dell'infezione e della risposta immune a NTHI nei bambini con otite media e negli adulti con BPCO.

Relativamente alla produzione, o non, di biofilm in emofilo esistono, in letteratura, diversi studi, nessuno dei quali, tuttavia, offre un'evidenza chiara della correlazione diretta tra fallimento della terapia antibiotica, o bronchiectasie, e presenza di biofilm nelle basse vie aeree. Così, ad esempio, Eldika e Sethi, nel valutare il ruolo di NTHI nella riacutizzazione e nella progressione della BPCO individuano alcuni possibili meccanismi che potrebbero consentire a questi microrganismi di persistere nelle vie respiratorie di pazienti con BPCO: invasione delle vie aeree, alterazione antigenica e formazione di biofilm. L'invasione dell'epitelio respiratorio è stato osservato nella BPCO grave e nell'ultimo stadio della malattia. I ceppi di NTHI che invadono gli strati cellulari epiteliali possiedono l'abilità di eludere tanto gli anticorpi quanto gli antibiotici [2]. Per tutti e tre i meccanismi succitati la letteratura di settore offre una evidenza scientifica [8-10].

Terapia delle riacutizzazioni di bronchite cronica

Ma in che consiste la riacutizzazione? È un deterioramento dei sintomi legato a numerose cause, la maggior parte delle quali prive di etiologia batterica: riduzione del flusso respiratorio, aumento della tosse e della dispnea, aumento del volume, della viscosità e della purulenza dell'espettorato [11].

È ben noto che quanto maggiore è la frequenza con la quale si verificano le riacutizzazioni, tanto peggiore è il declino funzionale del paziente, un elemento che obbliga, quindi, a un trattamento esaustivo di queste infezioni. Se la malattia cronica, infatti, determina un declino progressivo sia della funzione polmonare che della sintomatologia, la riacutizzazione influisce negativamente sulla gravità, sul numero di ospedalizzazioni, sulla mortalità e sulla qualità di vita [12].

Partendo dal presupposto che i pazienti ospedalizzati in seguito a riacutizzazione di BPCO sono ad elevato rischio di eventi avversi, Choi et al. hanno condotto uno studio teso a valutare la correlazione tra *gaps* terapeutici ed eventi avversi [13]. I risultati osservati dagli autori hanno lasciato concludere che nell'assistenza ospe-

daliera dei pazienti con BPCO i *gaps* sono frequenti e risultano associati con gli eventi avversi. Al di là di queste conclusioni, pure molto importanti, meritano di essere commentati i criteri individuati dagli autori dello studio e il cui mancato rispetto è stato definito come *gap* assistenziale. Infatti, anche queste norme gestionali molto accreditate, ovvero fondate sulle linee guida, sugli studi della letteratura e su documenti di consenso, se da un lato suggeriscono tutte le azioni da intraprendere dal punto di vista generale, in merito alla terapia antibiotica si limitano a raccomandare l'utilizzo di un antibiotico appropriato allorché siano presenti due o tre dei criteri indicati da Anthonisen, senza peraltro fornire indicazioni terapeutiche specifiche.

Va da sé che, invece, sono molteplici i fattori di cui tener conto nel selezionare la terapia antibiotica. *In primis*, stratificare i pazienti per gravità della malattia e presunta etiologia, valutare il pattern locale di resistenza, orientare la scelta terapeutica verso molecole di documentata efficacia, tenendo in grande considerazione le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche.

Per il trattamento della riacutizzazione batterica di bronchite cronica, le raccomandazioni delle linee guida internazionali ATS-ERS (*American Thoracic Society-European Respiratory Society*) distinguono tre livelli di gravità delle AECB a cui corrispondono altrettanti approcci terapeutici suggerendo l'utilizzo di molecole con caratteristiche e pattern di sensibilità/resistenza molto diversi (Tabella 2) [14].

Anche secondo l'algoritmo gestionale delle riacutizzazioni di BPCO, ultima revisione pubblicata nel 2008 da Sethi e Murphy il primo parametro di cui l'algoritmo tiene conto è la gravità - lieve o moderata-grave - del paziente [1]. Se per la forma lieve non è prevista nessuna terapia antibiotica, per la forma moderata-grave le indicazioni terapeutiche sono diverse, dovendo distinguersi la BPCO non complicata, in cui il paziente non presenta fattori di rischio, dalla BPCO complicata in cui, viceversa, il paziente presenta uno o più fattori di rischio. Nel primo caso, le opzioni terapeutiche saranno rappresentate dai macrolidi di ultima generazione, dalle cefalosporine - cefuroxime, cefpodoxime e cefdinir - da doxiciclina e cotrimossazolo mentre nel secondo caso la scelta ricadrà sui fluorochinoloni - moxifloxacina e levofloxacina - ma anche su amoxi-clavulanato. Nel caso in cui il paziente sia a rischio di infezione da pseudo-

Tabella 2 - AECB: Linee Guida Terapeutiche ATS-ERS (14).

| Livello di BPCO | Indicazioni generali | Antibiotici indicati |
|--|---|--|
| I Livello (paziente ambulatoriale) | <ul style="list-style-type: none"> • La terapia può essere iniziata nei pazienti con modificazioni delle caratteristiche dell'espettorato • La scelta dovrebbe basarsi sulla situazione locale delle resistenze | <ul style="list-style-type: none"> • amoxicillina/ampicillina • cefalosporine • doxiciclina • macrolidi Se sono fallite terapie antibiotiche precedenti: <ul style="list-style-type: none"> • amoxicillina/ac. clavulanico • fluorochinoloni respiratori (levofloxacin - moxifloxacin) |
| II Livello (paziente ospedalizzato) | <ul style="list-style-type: none"> • La terapia può essere iniziata nei pazienti con modificazioni delle caratteristiche dell'espettorato • La scelta dovrebbe basarsi sulla situazione locale delle resistenze | <ul style="list-style-type: none"> • amoxicillina/ac. clavulanico • fluorochinoloni respiratori (levofloxacin - moxifloxacin) Se si sospetta la presenza di <i>Pseudomonas spp.</i> e/o di altre Enterobacteriaceae va considerata una terapia di combinazione |
| III Livello (paziente critico) | La scelta dovrebbe basarsi sulla situazione locale delle resistenze | <ul style="list-style-type: none"> • amoxicillina/ac. clavulanico • fluorochinoloni respiratori (levofloxacin - moxifloxacin) Se si sospetta la presenza di <i>Pseudomonas spp.</i> e/o di altre Enterobacteriaceae, va considerata una terapia di combinazione |

monas, le linee guida suggeriscono l'esame culturale dell'espettorato e la possibilità di ricorrere a terapia antibiotica con fluorochinoloni ad attività anti-pseudomonas. La recente esposizione, negli ultimi 3 mesi, ad antibiotici costituisce indicazione all'utilizzo di una classe alternativa rispetto a quella utilizzata in precedenza.

Tuttavia, distinguere la terapia in funzione della gravità della patologia è passibile di qualche considerazione critica: terapie meno aggressive riservate alla fase non complicata della malattia mettono in forse l'eradicazione microbiologica, con la conseguenza, temibile, di far scivolare il paziente verso una fase complicata. Viceversa, è fortemente auspicabile che l'eradicazione microbiologica avvenga precocemente e non nella fase avanzata, quando il paziente ha una insufficienza respiratoria conclamata tale che qualsiasi terapia servirà solo ad aumentare di poco la sopravvivenza ma non a recuperare la funzionalità vitale. Nel trattamento degli episodi di riacutizzazione, la scelta dell'antibiotico dovrebbe fondarsi sui dati epidemiologici di sensibilità batterica agli antibiotici e considerare, quali possibili opzioni terapeutiche,

amoxi-clavulanato e fluorochinoloni respiratori. Laddove si sospetti una etiologia da pseudomonas e/o da enterobatteri, è opportuno considerare la possibilità di una terapia antibiotica di associazione, similmente a quanto si effettua per le bronchiectasie o per la fibrosi cistica anche se non raccomandato dalle varie Linee Guida.

La scelta deve basarsi sui criteri di appropriatezza, quali quelli C.A.R.A.T. (*Criteria for Accurate use of Antibiotic Therapy*), ovvero [15]:

- risultati fondati sull'evidenza
- benefici terapeutici
- sicurezza
- costo-efficacia
- dose del farmaco, e durata della terapia ottimali
- aggressività della terapia inversamente proporzionale alla durata (minore la durata della terapia, maggiore l'aggressività).

In merito alle scelte terapeutiche da compiere per il trattamento delle riacutizzazioni di BPCO, uno studio di Conte et al., volto a determinare i parametri farmacocinetici e intrapolmonari di levofloxacin, somministrata per via endovenosa, in soggetti con malattia polmona-

Tabella 3 - Differenze nei parametri clinici tra gruppi di pazienti con BPCO trattati con antibiotico alla fine dello studio (17).

| Parametro | Levofloxacin (n=45) | Antibiotico di confronto (n=48) | P |
|--|-------------------------|------------------------------------|------|
| Numero di riacutizzazioni | 33 (0,55; 0,63-1,23) | 41 (1,10; 0,71-1,49) | 0,40 |
| Intervallo libero da infezione (giorni) | 112 (90-135) | 101 (80-123) | 0,72 |
| Numero di ospedalizzazioni | 12 (0,32; 0,14-0,50) | 27 (0,72; 0,41-1,04) | 0,02 |
| Mediana e intervallo di confidenza 95% indicati tra parentesi. I valori sono stati calcolati su pazienti vivi alla fine dello studio. L'intervallo libero da infezione è da considerarsi medio | | | |

re cronica, in fase stabile, hanno stabilito che i rapporti C_{max}/MIC_{90} e AUC/MIC_{90} osservati nello studio forniscono un razionale farmacocinetico per la somministrazione di levofloxacin ad alte dosi nel trattamento delle infezioni respiratorie in questa tipologia di pazienti [16]. D'altra parte i dati ottenuti da un recente studio clinico nelle esacerbazioni acute di BPCO mostrano come 10 giorni di levofloxacin 500 mg/die hanno ridotto significativamente il numero di ospedalizzazioni rispetto al trattamento con antibiotici convenzionali (claritromicina 500 mg b.i.d., cefuroxime 500 mg b.i.d. e amoxicillina/ac. clavulanico 875/125 t.i.d.), con nel contempo una tendenza ad un numero di riacutizzazioni inferiore ed un intervallo libero da malattia superiore, anche se statisticamente non significativi (Tabella 3) [17].

La scelta del dosaggio dipende dal livello di gravità della riacutizzazione, dai fattori di rischio per patogeni multi-resistenti e dalle caratteristiche fisiopatologiche del paziente.

Al fine di individuare le cause del fallimento della terapia antibiotica, nell'ambito delle riacutizzazioni di BPCO, Grossman ha definito diversi fattori [18]:

- comorbilità (cardio-polmonare)
- frequenza di riacutizzazioni batteriche/BPCO
- età avanzata
- condizioni generali scadenti
- malnutrizione
- ostruzione grave.

Similmente, Ball et al. indicano le cause di fallimento nella presenza di malattie cardiopolmonari e in un numero di episodi di AECB superiore a 4 nell'anno precedente [19]. A questi stessi fattori, Dewan et al. aggiungono un valore di $FEV_1 < 35\%$, l'uso di steroidi e una anamnesi positiva di polmonite pregressa. Inoltre, questi

stessi autori concludono che siano i fattori intrinseci all'ospite, e non la scelta dell'antibiotico, a determinare l'outcome del trattamento [20].

Nessun autore, tuttavia, prende in considerazione l'eventuale inapproprietezza della terapia antibiotica né tantomeno l'ipotetica esistenza del biofilm. D'altro canto, "... Le tecniche ordinarie utilizzate in laboratorio per determinare la sensibilità antibiotica dei batteri planctonici non possono predire la possibilità di eradicazione dei batteri presenti in un biofilm. La resistenza agli antibiotici espressa da tali batteri può essere ascritta a diversi fattori, quale la lenta crescita, ridotte concentrazioni di ossigeno alla base del biofilm, forse una barriera di penetrazione basata sul legame, ad esempio, di aminoglicosidi carichi positivamente ai polimeri di alginato carichi negativamente, la produzione di beta-lattamasi. L'accresciuta resistenza dei batteri di un biofilm significa che la terapia antibiotica, generalmente considerata, fallisce nonostante gli ordinari test di sensibilità effettuati in laboratorio dimostrino la sensibilità agli antibiotici utilizzati. Tuttavia, il trattamento antibiotico regolarmente somministrato determina un miglioramento clinico temporaneo del paziente e della funzione polmonare, congiuntamente alla riduzione del numero (CFU; colony forming units) di batteri (planctonici) nell'espettorato..." [5].

Nuovi approcci terapeutici

Come si è già avuto modo di affermare altrove nel testo, la riacutizzazione di BPCO e la fibrosi cistica, pur rappresentando entità nosologiche distinte, condividono diverse caratteristiche che dovrebbero indurre ad assumere, ad esempio, un atteggiamento terapeutico simile e considerare la possibilità che la terapia antibiotica,

da sola, possa non essere efficace o che, almeno, la sua efficacia è correlata alla tempestività del trattamento, da eseguire nelle fasi precoci della malattia, senza riservarlo alle fasi avanzate, quando si osserva già un evidente deterioramento funzionale.

Dunque l'attenzione si va rivolgendo anche verso opzioni terapeutiche diverse: "... una terapia antiossidante a base di N-acetilcisteina può rappresentare un nuovo modo di ritardare lo sviluppo della resistenza convenzionale agli antibiotici da parte di *P. aeruginosa* nei pazienti con fibrosi cistica..." [5]. Tali affermazioni attribuiscono nuovo significato a un farmaco, la N-acetilcisteina, da sempre utilizzato come una sorta di placebo palliativo, e che invece oggi ha la potenzialità di svolgere un ruolo terapeutico più determinato, in associazione ad antibiotici appropriati se, come si ritiene, il biofilm esplica effettivamente un ruolo rilevante.

Nei biofilm di *P. aeruginosa* è stata recentemente dimostrata, inoltre, la presenza di DNA extracellulare, essenziale per il precoce sviluppo del biofilm. La DNAasi I bovina è in grado di inibire tale sviluppo suggerendo, dunque, che un suo tempestivo utilizzo, in profilassi, nei pazienti con fibrosi cistica può prevenire lo stabilirsi dell'infezione polmonare cronica sostenuta da tale microorganismo [21]. Un'altra possibilità consiste in quella che viene definita "chemioterapia di mantenimento" (terapia soppressiva cronica o terapia di elezione) effettuata utilizzando tobramicina, per via endovenosa, in combinazione con un β -lattamico [22].

Il meccanismo di azione degli antibiotici nell'infezione cronica causata da *P. aeruginosa* nel biofilm non è del tutto chiarito. Nonostante la modalità di crescita del biofilm sia la caratteristica peculiare dell'infezione, nel polmone si riscontrano comunque anche batteri planctonici sen-

sibili agli antibiotici. Inoltre, studi *in vivo* hanno dimostrato che il numero di batteri che producono biofilm possono essere ridotti al 20% da dosi elevate di associazioni di antibiotici [5].

In natura sono stati rilevati alcuni promettenti agenti in grado di inibire il *quorum sensing*, come i furanononi alogenati, prodotti da alghe del genere *Delisea pulchra*. Tali composti possono anche prevenire, o distruggere, i biofilm prodotti da *P. aeruginosa* nei polmoni di pazienti con fibrosi cistica [23].

Un nuovo gruppo di molecole che pure si configura particolarmente promettente è quello degli antibiotici peptidici, alcuni dei quali sono dotati di elevata attività nei confronti di *P. aeruginosa*. È auspicabile che lo sviluppo di questi farmaci preveda l'utilizzo per via inalatoria [5].

Un altro dei possibili, nuovi approcci terapeutici è quello che scaturisce dal sinergismo che è stato descritto tra alcuni β -lattamici e specifici fosfolipidi, che aumentano la permeabilità della membrana esterna di *P. aeruginosa* legando sia ioni Ca^{++} che Mg^{++} [24].

Un ultimo accenno spetta ad un nuovo, interessante principio utilizzato per determinare batteriocidia dei microrganismi del biofilm, quanto meno *in vitro*, consistente in una combinazione di antibiotici e di elettricità (DC, 10-20 V, 20 mA, distanza di 2,5 mm) [25]. Questa combinazione determina *killing* batterico nel biofilm nonostante né gli antibiotici né la corrente elettrica risultino efficaci se singolarmente considerati.

Se, e in che misura, questi nuovi approcci terapeutici potranno essere applicabili all'infezione polmonare sostenuta da *P. aeruginosa* nei pazienti con fibrosi cistica è un argomento che rimane da chiarire.

Key words: COPD, ABECOPD, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*.

RIASSUNTO

La basse vie aeree dei pazienti affetti da BPCO sono costantemente colonizzate da germi patogeni quali *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*. Il ruolo della colonizzazione batterica delle grandi e piccole vie aeree nei pazienti affetti da BPCO non è chiaro certo è che verosimilmente contribuiscono a mantenere direttamente o indirettamente il circolo vizioso dell'infezione/infiammazione. I patogeni colonizzanti sono in grado di stimolare la produzione di muco, di alterare la funzione ciliare in-

ducendo discinesie e stasi ed inoltre sono un potente stimolo di richiamo nelle vie aeree di neutrofili che rilasciano elastasi che a loro volta inibiscono la funzione mucociliare.

Gli stessi patogeni sono responsabili di danno epiteliale e di infiammazione cronica con rilascio di elastasi neutrofila responsabile della progressione del danno e dell'ostruzione. I germi presenti nelle basse vie aeree colonizzanti o responsabili di infezione cronica rilasciano proteine e lipoligosaccari-

di (LOS) e peptidoglicano che sono potenti proinfiammatori.

Recenti studi hanno inoltre dimostrato come l'infezione da *H. influenzae* non sia limitata alla mucosa bronchiale, cioè alle cellule epiteliali di superficie ma che il patogeno sia in grado di penetrare nelle cellule e che passando tra le cellule di superficie possa provocare l'infezione negli strati cellulari sottoepiteliali. Questa localizzazione batterica pertanto oltrepassa il lume respiratorio, cioè l'adesione alle cellule della mucosa epiteliale, e raggiunge l'interstizio sottomucoso e le cellule respiratorie. Inoltre tra i vari meccanismi di difesa batterici la

capacità da parte di alcuni germi di produrre il biofilm che li rende impenetrabili da parte dell'antibiotico consente la loro libera crescita e la colonizzazione. Questi meccanismi possono in parte spiegare la mancata risposta alla terapia antibiotica e contribuire alla stimolazione della risposta infiammatoria parenchimale che è la causa del danno anatomico-patologico della BPCO. L'impossibilità all'eradicazione stabile dell'infezione cronica e le riacutizzazioni batteriche della BPCO sono pertanto verosimilmente i fattori innescanti ed aggravanti l'ostruzione e determinanti nella progressione della malattia.

SUMMARY

The lower respiratory tract of patients affected by COPD is constantly colonized by pathogenic microorganisms such as H. influenzae, M. catarrhalis and S. pneumoniae. Role of bacterial colonization of big and small airways in patients affected by COPD is still unclear but it is likely to play a role in directly or indirectly maintaining the vicious circle of infection/inflammation. Colonizer pathogens are capable to stimulate mucus production, to alter the ciliary function by inducing dyskinesia and stasis; in addition, they represent a strong stimulus for neutrophils to come in the airways, which release elastase that, in turn, inhibit the mucus-ciliary function. The same pathogens are responsible for epithelial damage and chronic inflammation, by releasing neutrophilic elastase, leading to the damage progression and obstruction.

Recent studies have also shown that infection sustained by H. influenzae is not limited to bronchial mucosa, i.e. surface epithelial cells, but that the pathogen is capable to penetrate cells, so spreading the infection in sub-epithelial cellular layers.

In addition, the ability to produce biofilm is another possible defence mechanism which allows them to grow and colonise.

Such a mechanism could in part explain the lack of response to antimicrobials and contribute to stimulation of parenchymal inflammatory response, the cause of pathological-anatomic damage which occurs in COPD. The impossibility to eradicate chronic infection and bacterial exacerbations of COPD are likely the elements that prompt and worsen obstruction, so determining the disease's progression.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Sethi S., Murphy T.F. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 27, 359 (22), 2355-2365, 2008.
- [2] Eldika N., Sethi S. Role of nontypeable *Haemophilus influenzae* in exacerbations and progression of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 12 (2), 118-124, 2006.
- [3] Sethi S., Muscarella K., Evans N., Klingman K.L., Grant B.J., Murphy T.F. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 118 (6), 1557-1565, 2000.
- [4] Eller J., Ede A., Schaberg T., Niederman M.S., Mauch H., Lode H. Infective exacerbations of chronic bronchitis: relation between bacteriologic etiology and lung function. *Chest* 113 (6), 1542-1548, 1998.
- [5] Høiby N. Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J. Cyst. Fibros.* 1 (4), 249-254, 2002.
- [6] Martínez-Solano L., Macia M.D., Fajardo A., Oliver A., Martinez J.L. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Infect. Dis.* 47 (12), 1526-1533, 2008.
- [7] Murphy T.F., Kirkham C. Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol.* 15, 2-7, 2002.
- [8] Poolman J.T., Bakaletz L., Cripps A., Denoel P.A., Forsgren A., Kyd J., Lobet Y. Developing a nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) vaccine. *Vaccine* 8, 19 (Suppl 1), S108-S115, 2000.
- [9] Sethi S., Murphy T.F. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000. A state of the art review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 336-363, 2001.
- [10] Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 34, 586-595, 1999.
- [11] Anthonisen N.R., Manfreda J., Warren C.P., Her-shfield E.S., Harding G.K., Nelson N.A. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pul-

- monary disease. *Ann. Intern. Med.* 106 (2), 196-204, 1987.
- [12] Vestbo J. What is an exacerbation of COPD? *Eur. Respir. Rev.* 13, 88, 6-13, 2004.
- [13] Choi P.P., Day A., Etchells E. Gaps in the care of patients admitted to hospital with an exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *CMAJ* 170 (9), 1409-1413, 2004.
- [14] Celli B.R., MacNee W. ATS/ERS Task Force Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper *Eur. Respir. J.* 23: 932-946, 2004.
- [15] Slama T.G., Amin A., Brunton S.A., et al. and Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy (CARAT). A clinician's guide to the appropriate and accurate use of antibiotics: the Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy (CARAT) criteria. *Am. J. Med.* 118 Suppl 7A: 1S-6S, 2005.
- [16] Conte J.E. Jr, Golden J.A., McIver M., Little E., Zurlinden E. Intrapulmonary pharmacodynamics of high-dose levofloxacin in subjects with chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (5), 422-427, 2007.
- [17] Ruiz-Gonzalez A., Gimenez A., Gomez-Arbones X., Soler-Gonzalez J., Sanchez V., Falguera M., Porcel J.M. Open label, randomized comparison trial of long-term outcomes of levofloxacin versus standard antibiotic therapy in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 12, 117-121, 2007.
- [18] Grossman R.F. The value of antibiotics and the outcomes of antibiotic therapy in exacerbations of COPD. *Chest* 113 (Suppl 4), 249S-255S, 1998.
- [19] Ball P., Harris J.M., Lowson D., Tillotson G., Wilson R. Acute infective exacerbations of chronic bronchitis. *QJM* 88 (1), 61-68, 1995.
- [20] Dewan N.A., Rafique S., Kanwar B., et al. Acute exacerbation of COPD: factors associated with poor treatment outcome. *Chest* 117 (3), 662-671, 2000.
- [21] Eckhart L., Fischer H., Barken K.B., Tolker-Nielsen T., Tschachler E. DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Dermatol.* 156 (6), 1342-1345, 2007.
- [22] Cantón R., Cobos N., de Gracia J., et al. and the Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 11 (9), 690-703, 2005.
- [23] Wu H., Song Z., Hentzer M., Andersen J.B., Molin S., Givsskov M., Høiby N. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (6), 1054-1061, 2004.
- [24] Cernohorská L., Votava M. Antibiotic synergy against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia Microbiol. (Praha)*. 53 (1), 57-60, 2008.
- [25] del Pozo J.L., Rouse M.S., Mandrekar J.N., Steckelberg J.M., Patel R. The electricidal effect: reduction of *Staphylococcus* and *pseudomonas* biofilms by prolonged exposure to low-intensity electrical current. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (1), 41-45, 2009.