



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
SCUOLA DI DOTTORATO IN PEDIATRIA CLINICA E PREVENTIVA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE DELL'ETÀ
EVOLUTIVA**

XXII CICLO
Anno Accademico 2008-2009
Settore Disciplinare di Appartenenza MED38
Curriculum: Immunologia Pediatrica

**LA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSI E
SORVEGLIANZA DELLE POLMONITI PNEUMOCOCCICHE
BATTERIEMICHE**

Coordinatore del Corso
Prof. Paolo Antonio Nassi

Tutor
Prof. Chiara Azzari

Candidato
Dott. Maria Moriondo

INDICE

<u>1. INTRODUZIONE.....</u>	<u>3</u>
<u>2. PAZIENTI E METODI.....</u>	<u>4</u>
<u>4 RISULTATI.....</u>	<u>8</u>
<u>5 DISCUSSIONE.....</u>	<u>19</u>
<u>6 BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>75</u>

INTRODUZIONE

Lo *Streptococcus pneumoniae* (pneumococco) è la causa più comune di polmonite acquisita in comunità (CAP) nei bambini e negli adulti (1). Dopo l'introduzione del vaccino anti-pneumococcico coniugato (PCV-7) abbiamo assistito a un declino significativo dell'incidenza della malattia invasiva da pneumococco (IPD) e delle ospedalizzazioni (2-7).

Gli aggiornamenti riguardanti l'epidemiologia delle infezioni causate da *Streptococcus pneumoniae* è di fondamentale importanza, in quanto diversi fattori possono attenuare l'efficacia futura del vaccino, in particolare l'emergere di sierotipi non contenuti nel vaccino o la crescente diffusione di pneumococchi particolarmente patogeni.

I dati disponibili sulla distribuzione dei sierotipi circolanti dello pneumococco sono stati ottenuti fino ad ora grazie alla determinazione del tipo capsulare mediante le normali tecniche sierologiche (dopo la crescita in cultura) o dalla tipizzazione molecolare degli isolati (8-10). Tuttavia l'efficacia di questi metodi è limitata a causa della necessità di crescita batterica in coltura che a sua volta dipende dalla presenza di un sufficiente numero di batteri vitali nei campioni biologici.

I bambini affetti da polmonite sono a basso rischio di batteriemia (11) e quando è presente la batteriemia, la carica batterica è solitamente bassa rendendo così difficile l'isolamento microbiologico (12).

Inoltre, l'uso di antibiotici prescritti dal medico curante all'inizio degli episodi febbrili riduce in modo significativo la sensibilità della cultura (13).

Recentemente è stato dimostrato che i metodi molecolari applicati su campioni di sangue o altri fluidi corporei può essere efficacemente usato per la diagnosi e la sierotipizzazione di IPD (13-17). Questi

metodi non richiedono batteri vitali, hanno bisogno di piccoli volumi e ad oggi sembrano più sensibili rispetto ai metodi culturale. Proprio per questo, i metodi molecolari potrebbero essere un utile strumento per la diagnosi e la sierotipizzazione delle polmoniti pneumococciche (18).

Lo scopo del presente studio era quello di effettuare la diagnosi e la sierotipizzazione delle polmoniti pneumococciche batteriemiche con Real Time PCR (RT-PCR) direttamente su campioni di sangue in un'ampia coorte di bambini italiani ricoverati in ospedale con diagnosi di CAP e confrontare la sensibilità dei metodi molecolari in relazione ai metodi di basati sulla coltura.

PAZIENTI E METODI

Questo studio osservazionale è stato condotto da aprile 2007 a giugno 2009. È stato progettato per ottenere la diagnosi e la sierotipizzazione di infezione pneumococcica in una vasta popolazione di bambini ricoverati con una diagnosi di CAP in ospedali pediatrici o reparti pediatrici degli ospedali in italiani. Sono state invitate a partecipare gli ospedali di tutte le regioni italiane.

La polmonite è stata sospettata in presenza di segni clinici, quali tachipnea e rumori respiratori anomali ed è stata confermata dalla radiografia del torace o la tomografia computerizzata (CT) coerente con la polmonite (19). La polmonite complicata (C-CAP) è stata definita dalla presenza di uno o più dei seguenti parametri: 1) versamento parapneumonico, 2). presenza di liquido pleurico coerente con empiema (19) 3).atelectasia o polmonite necrotizzante (20).

I bambini sono stati considerati completamente vaccinati se avevano completato il programma nazionale di vaccinazione, 3 dosi di 7-

valente coniugato vaccino anti-pneumococco (PCV-7) a 3, 5 e 12 mesi di età o una singola dose dopo il primo anno di la vita. I bambini sono stati considerati non completamente vaccinati se avevano avviato ma non completato il programma di vaccino.

Pazienti

Sono stati inclusi nello studio tutti i bambini e gli adolescenti di età compresa tra 0 a 16 anni ospedalizzati nei centri partecipanti con una diagnosi di polmonite (da Aprile 2007 a giugno 2009). All'ingresso sono stati registrati tutti i dati relativi all'eventuale precedente trattamento antibiotico, nonché al numero di dosi di vaccino anti-pneumococcico ricevute. I criteri di esclusione erano: gravi malattie concomitanti (neoplasie, infezioni renali o malattie del fegato, immunodepressione, malattie cardiovascolari, sindrome da malassorbimento), e infezioni nosocomiali acquisite. Al fine di escludere questi ultimi, i bambini che erano stati ricoverati in ospedale o erano stati valutati in Day Hospital e pronto soccorso negli ultimi 14 giorni sono stati esclusi dallo studio. Il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i genitori o tutori prima dell'inizio dello studio. Lo studio è stato approvato da ciascun comitato etico interno all'ospedale.

Test microbiologici

Per ogni bambino, è stata prelevato, il prima possibile dopo l'ingresso in ospedale, una aliquota di sangue intero necessaria per i test molecolari. Laddove è stato possibile è stata anche raccolta una aliquota di sangue (4-6 ml) per eseguire l'emocoltura presso i laboratori del luogo di provenienza.

I campioni di sangue necessari per la diagnosi molecolare sono stati raccolti e inviati da tutta Italia al Laboratorio di Immunologia dell'ospedale Anna Meyer di Firenze a temperatura ambiente

utilizzando un sistema di trasporto veloce (max 12 ore). I campioni, una volta giunti in laboratorio, sono stati analizzati entro 2 ore.

Diagnosi di polmonite pneumococcica batteriémica.

La diagnosi di laboratorio di polmonite pneumococcica batteriémica è stato fatto in base alla presenza di una cultura positiva per *Streptococcus pneumoniae* e/o a una RT-PCR positiva per il gene *lytA* come precedentemente descritto (15). Se dopo i 45 cicli di amplificazione non si osservava nessun incremento di segnale di fluorescenza il campione era dichiarato negativo. La specificità della RT-PCR su sangue intero era stata preliminarmente valutata mediante test su campioni di sangue prelevati da 87 controlli appaiati per età e in buona salute. Il DNA dello pneumococco non è mai stato evidenziato nel sangue di bambini sani, a prescindere dal loro stato di portatori sani di *Streptococcus pneumoniae* (Azzari C., Canessa C, Indolfi G, Moriondo M, Cortimiglia M, Becciolini L, Bartolini E., Lippi F, de Martino M, Resti M. Pneumococcal DNA is not present in blood of healthy children. 7th International Symposium on pneumococci and pneumococcal diseases. Tel Aviv, Israele, 14-18 marzo, 2010, pagina 213).

Analisi quantitativa di DNA di *Streptococcus pneumoniae*

Per quantificare il DNA batterico presente in ciascun campione, sono stati preparati gli standard come precedentemente descritto (12) usando sospensioni di *Streptococcus pneumoniae* in PBS. Poiché il *lytA* è un gene a singola copia, il numero di copie misurato è equivalente al numero batteri presenti nel campione (21). Dopodiché la quantità di DNA batterico è stata ottenuta mediante estrapolazione diretta dei valori di CT ottenuti con la quantità di DNA (in copie / ml).

Sierotipizzazione con Realtime PCR

Tutti i campioni che sono risultati RT-PCR positivo per il gene *lytA* sono stati inclusi nell'analisi sierotipizzazione. In totale sono state disegnate 21 coppie di primers e sonde specifiche per altrettanti 21 sierotipi di *S. pneumoniae* (15).

La reazione di amplificazione in Real time PCR è stata effettuata in 25 µl contenenti: 1x TaqMan Universal master Mix, primers specifici per ogni sierotipo alla concentrazione di 400nM, sonda specifica per ogni sierotipo alla concentrazione di 400nM se marcata in JOE o 200nM se marcata in FAM.

Per ogni reazione sono stati usati 6 µl di DNA estratto. Ogni reazione è stata eseguita in triplicato. In tutti i test sono stati inclusi sia controlli negativi (acqua sterile) che controlli positivi (campioni di sangue e/o liquor positivi per *S. pneumoniae* sia con metodi colturali che molecolari).

Tutti i test sono stati eseguiti su un apparecchio ABI 7500 SDS usando per tutte le coppie primers/sonde sierotipo specifiche lo stesso profil termico: 50°C per 2' , 95°C per 10' seguito da 45 cicli di 95°C 1', 60°C 30'' . Se dopo i suddetti 45 cicli non si osservava nessun incremento di segnale di fluorescenza il campione era dichiarato negativo per quello specifico sierotipo e dichiarato non tipizzabile (14,15).

I sierotipi dello pneumococco sono stati classificati come "sierotipi PCV-7" se inclusi nel vaccino coniugato (4,6 B, 9V, 14,18 C, 19F, 23F). Sono stati classificati come " sierotipi correlati a PCV-7 " se appartenenti allo stesso sierogruppo (6A, 9A, 9L, 9N, 18A, 18B, 18F, 19B, 19C, 23A, 23B). Tutti gli altri, tra cui 19A, noti per essere non cross-reattivi con 19F, sono stati classificati come "sierotipi non contenuti nel vaccino" (22).

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati elaborati con il programma SPSSX (SPSS 11.0) (SPSS Inc, Chicago, IL).

RISULTATI

Diagnosi di infezione

Nel presente studio sono stati inclusi 753 bambini [417 (55.4%) maschi, 336 (44.6%) femmine, ratio 1.24; mediana 3.8 anni,]. Questi sono stati raccolti da 83 centri italiani rappresentativi di 19/20 regioni italiane. L'unica regione che non ha partecipato rappresenta lo 0.2% della popolazione italiana sotto i 16 anni di età. Di questi 177 bambini (23.5%) avevano un'età inferiore a 2 anni.

Polmoniti complicate e non.

Dei 753 bambini inclusi nello studio 162 (21.5%) presentavano una polmonite complicata. La distribuzione delle complicanze è mostrata nella tabella 1.

In generale i bambini che presentavano complicanze polmonari avevano un'età significativamente maggiore, livelli di proteina C reattiva più alta e una conta di neutrofili nettamente più alta (tabella 2). Nessuna differenza invece è stata rilevata nell'incidenza delle polmoniti complicate tra i bambini trattati con antibiotici prima dell'ospedalizzazione (80 complicate su 401 trattati; 20.0%) e quelli non trattati (82 complicate su 352 non trattate; 23.3%).

In 94 bambini è stata diagnosticata polmonite lobare; la frequenza delle complicanze (31/94; 33.0%; 1 atelectasia, 30 versamento parapneumonico) era più alta nelle polmoniti lobari che in quelle con

altre caratteristiche radiologiche (131/658, 19.9%; $p=0.007$, OR 1.95; 95% CL= 1.18-3.19).

Diagnosi polmonite pneumococcica batteriemica con Realtime PCR e/o coltura.

Tutti i 753 casi sono stati analizzati: 292 sono stati testati sia con la RT-PCR che con la coltura mentre 461 solo con la RT-PCR. Nei 292 campioni di sangue testati sia con la coltura che con la RT-PCR lo *Streptococcus pneumoniae* è stato diagnosticato in 47 bambini (16.1%), e precisamente in 45/292 casi solo con la RT-PCR (15.4%) e in 11/292 con la coltura (3.8%).

La RT-PCR risulta significativamente più sensibile (4 volte di più) della coltura nella diagnosi della polmonite batteriemica (X^2 test: $p<10^{-6}$, OR 30.6, 95%CL 5.8-97.5; Cohen's Kappa misurando l'accordo tra RT-PCR e coltura: 0.3; McNemar $p<10^{-6}$). Complessivamente lo *Streptococcus pneumoniae* è stato identificato solo grazie alla RT-PCR in 36/47 casi (76.6%), solo con la coltura in 2/47 casi (4.3%) e in 9/47 casi (19.1%) con entrambi i metodi.

Il trattamento antibiotico ricevuto prima dell'ospedalizzazione era stato somministrato in 6/11 pazienti (54.5%) diagnosticati con la coltura e in 55/80 pazienti (68.7%) diagnosticati con la RT-PCR ($p=ns$). Nessuna differenza è stata trovata per quanto riguarda l'età media tra i pazienti con coltura positiva (età media 5 anni, range 0.45-14.5) e quelli con RT-PCR positiva (età media 3.74, range 0.03-14.5; $p=ns$). La tendenza dei clinici è stata quella di richiedere test colturali nei casi più severi. Infatti le colture sono state richieste in 217/591 (36.7%) casi di polmoniti non complicate e in 75/162 (46.2%) casi di polmoniti complicate ($p=0.034$, 95% CL 1.03-2.14). Questi dati sono confermati dai risultati ottenuti con la RT-PCR. Infatti la RT-PCR è

risultata positiva in 45/292 (15.4%) casi in cui sono stati eseguiti entrambi i test e in 37/461 (7.6%) casi in cui la coltura non è stata eseguita e, complessivamente, in 80/753 (10.6%) casi di polmonite.

In totale 82/753 (10.9%) casi sono risultati positivi per *Streptococcus pneumoniae* [40/82 maschi (48.8 %), 42/82 (51.2 %) femmine]. Di questi 20 bambini avevano un'età inferiore a 2 anni (Tabella 3). Nessuna differenza nella la distribuzione delle polmoniti batteriemiche è stata trovata tra bambini inferiori a 2 anni di età e quelli più grandi (2-16 anni di età), con entrambi i metodi (Tabella 3). La coltura, oltre agli 11 campioni positivi per *Streptococcus pneumoniae*, ha evidenziato la presenza di 2 casi di *Staphylococcus epidermidis* e 1 caso di *Staphylococcus hominis*. Questi 3/292 casi sono stati considerati come contaminazione batterica direttamente dai laboratori di microbiologia che li hanno effettuati. Non è stato evidenziato nessun altro agente eziologico, a parte lo *Streptococcus pneumoniae*.

Associazione tra complicanze e batteriemia.

I dati demografici clinici di laboratorio in relazione alla diagnosi di *Streptococcus pneumoniae* nel sangue tramite RT-PCR sono mostrati nella tabella 1. I livelli di proteina C reattiva e la quantità dei globuli bianchi erano significativamente più alti nei bambini con polmonite pneumococcica. La positività sia alla coltura che alla RT-PCR si associa in maniera significativa alla presenza di complicanze (Tabella 2).

Analisi quantitativa del DNA di pneumococco.

La mediana della carica batterica (tutti i casi) era 2,16 Log copie/ml (range 1-5.88 Log copie/ml, equivalenti a 10-750,000 copie/ml).

Nessuna differenza è stata rilevata tra le polmoniti complicate e non: rispettivamente mediana 2.32 (range 1-2.88) versus 2.30 (range 1,60-

5.88). La carica batterica era significativamente più alta nei pazienti con coltura positiva (mediana 2.70, range 1.60-5.88 versus mediana 2.25, range 1,60-2,88 in pazienti con coltura negativa, $p=0.031$, 95% CL 0.06-1.16) e tende ad essere più alta nei pazienti con età maggiore di 2 anni (Tabella 3). I CT si distribuiscono tra 24 e 40.

Sierotipizzazione

La sierotipizzazione con i metodi molecolari è stata eseguita in tutti i campioni risultati positivi per il gene *lytA* con RT-PCR.

Questa tecnica ha permesso di sierotipizzare 73/80 (91.2%) polmoniti batteriemiche: rispettivamente 38/44 (86.4%) polmoniti non-complicate e 35/36 (97.2%) polmoniti complicate. In 3/7 bambini non è stato possibile eseguire la sierotipizzazione a causa dell'esiguità del campione di sangue. In 4/7 bambini invece lo *Streptococcus pneumoniae* non apparteneva ai 21 compresi in questo studio. La distribuzione dei sierotipi, nell'intera popolazione studiata e nei casi di polmonite complicata, è rappresentata rispettivamente nella figura 1 e 2. Gli 11 sierotipi riscontrati nei pazienti che avevano un risultato positivo in coltura erano i seguenti: sierotipo 1 e 3 (2 isolati ciascuno), sierotipi 5,6A,8,9V,14,18C e 19A (1 isolato ciascuno). Nessuna discordanza è stata riscontrata tra la sierotipizzazione classica e quella molecolare.

Il sierotipo più frequente è risultato essere l'1 26/80 (32.5%), seguito dal sierotipo 19A (15%) e dal 3 10/80 (12.5%). Il sierotipo 1 in più si associa in maniera significativa con le polmoniti complicate con una frequenza di 18/36 (50%) nei casi complicati vs 8/44 (18.2%) nei casi non complicati ($p=0.0054$, OR 4.5, 95% CL 1.48-14.03). I pazienti con sierotipo 1 erano significativamente più grandi di quelli che non lo avevano (età media 5.6 anni, range 3.3-13.7 anni vs 2.4 anni, range 10 giorni-14.3 anni, $p=0.001$, 95% CL 1.02-4.01). I pazienti con

sierotipo 19A erano invece significativamente più giovani di quelli che non lo avevano (media età 3.1 anni, range 10 mesi-3.7 anni vs 5.4 anni, range 11 mesi-14.3 anni; $p=0.023$, 95%CL 0.21-2.61). il sierotipo 1 è presente unicamente nei bambini con età superiore ai 2 anni (42.6% dei casi); nei bambini sotto i due anni la distribuzione dei sierotipi è molto più omogenea variando tra 5.3% (sierotipi 4, 5 e 18) e 15,8% (sierotipi 19A e 19F).

Stato vaccinale

Dei 753 partecipanti allo studio 270 (35.8%) aveva ricevuto il ciclo completo di vaccinazione del PCV-7; 387/753 (51.4%) non era vaccinato e 41/753 (5.4%) aveva ricevuto solo 1 o 2 dosi di vaccino nel primo anno di vita e quindi sono stati considerati non completamente vaccinati. Per 55/753 bambini non è stato possibile recuperare i dati sulla vaccinazione. Dei 73 bambini con infezione da *Streptococcus pneumoniae* sierotipizzati con i metodi molecolari, 25/73 erano vaccinati, 3/73 erano vaccinati in modo incompleto, 40/73 non erano vaccinati affatto e per 5/73 non erano disponibili i dati. In questi tre gruppi non è stata riscontrata nessuna differenza nella distribuzione delle polmoniti complicate (87 complicanze in 387 (22.5%) pazienti non vaccinati; 58 complicanze in 311 (18.6%; $p=ns$) pazienti vaccinati (completamente o non).

Polmoniti causate da sierotipi PCV-7 o ad essi correlati (13/73 tra i casi sierotipizzati 17.8%) sono state diagnosticate unicamente nel gruppo dei bimbi non vaccinati.

DISCUSSIONE

Il questo studio, che è stato condotto su un'ampia coorte di bambini italiani ospedalizzati per CAP provenienti da 83 ospedali distribuiti

sull'intero territorio nazionale, si mette in evidenza che circa il 10% di polmoniti ospedalizzate sono polmoniti pneumococciche batteriemiche quando, per fare la diagnosi, si utilizza la RT-PCR direttamente dai campioni di sangue. La RT-PCR è significativamente più sensibile della coltura per la diagnosi delle polmoniti pneumococciche batteriemiche.

La RT-PCR è estremamente sensibile ma è necessario che sia altrettanto specifica. Per questo nello studio sono stati utilizzati due differenti geni target (lytA e CPS) riconosciuti come i più specifici (14,15). In aggiunta abbiamo dimostrato che usando come target il gene LytA nella RT-PCR, nel sangue di bambini sani non è mai stato evidenziato la presenza di DNA pneumococcico, a prescindere dal loro stato di portatori. (Azzari et al. Pneumococcal DNA is not present in blood of healthy children. 7th International Symposium on pneumococci and pneumococcal diseases. Tel Aviv, Israel, March 14-18, 2010, page 213). Questo sembra dimostrare che l'estrema sensibilità di questa tecnica non influisce negativamente sulla specificità del test.

Sebbene sia stato possibile eseguire coltura e RT-PCR contemporaneamente solo su 292 casi, lo studio dimostra una frequenza di polmoniti pneumococciche batteriemiche più alta (3.8%) rispetto al passato (1.6-2%, 11, 23). La frequenza più alta è probabilmente dipendente dal fatto che ai clinici era consentito scegliere quando richiedere sia la RT-PCR che la coltura. Come dimostrato dai nostri dati, i clinici hanno richiesto la coltura più spesso nelle polmoniti complicate e quindi c'è stata una probabilità maggiore che la coltura risultasse positiva. Se si selezionano i casi di polmonite più gravi nel gruppo dei casi testati con la coltura la sensibilità della coltura risulta aumentata (e quindi, ovviamente, va verso l'ipotesi

nulla dello studio che era volto a dimostrare la maggiore sensibilità della RT-PCR vs il metodo basato sulla cultura) e comunque la maggiore sensibilità della RT-PCR è stata dimostrata.

Effettivamente la RT-PCR ha evidenziato una frequenza di circa il 10% di polmoniti pneumococciche batteriemiche quando sono stati raggruppati tutti i casi di polmonite che aumenta fino al 16% nel gruppo di pazienti in cui i test molecolari e colturali sono stati eseguiti contemporaneamente.

Nel approccio clinico, i test molecolari sembrano avere una sensibilità di quattro volte superiore a quello della cultura. La differenza in parte può essere dovuta all'assunzione di antibiotici prima dell'ospedalizzazione che indubbiamente riduce la sensibilità della coltura (13) ma che sembra invece avere un effetto minore sulla sensibilità della RT-PCR, anche se la differenza non è statisticamente significativa

La proteina C reattiva, il numero dei bianchi e/o dei neutrofilo si associano in maniera statisticamente significativa con l'eziologia pneumococcica e con le complicanze. Ma difficilmente questi dati possono essere usati per determinare l'eziologia della polmonite o le possibili complicanze nel singolo paziente.

Le analisi quantitative dimostrano, come atteso, che la carica batterica è significativamente più alta nei pazienti con coltura positiva e tende a essere più alta nei bambini con età maggiore di 2 anni. Al contrario non si riscontra nessuna differenza tra i casi complicati e quelli non complicati. Questo può essere dovuto al fatto che altri fattori entrano in gioco nel causare le complicanze come l'aggressività del singolo sierotipo o la risposta immune del paziente.

La distribuzione dei sierotipi dimostra una larga preponderanza del sierotipo 1 seguito dal 19A e dal 3. I dati ottenuti sierotipizzando

direttamente da sangue periferico rispecchiano quelli ottenuti dalla sierotipizzazione degli isolati batterici nei paesi occidentali (24). Il numero limitato di colture positive non consente di valutare se il vantaggio della PCR potrebbe essere sierotipo specifico. Tuttavia la distribuzione in vari sierotipi degli isolati batterici suggerisce che il vantaggio della PCR non è sierotipo specifico.

Quando si prendono in considerazione separatamente i bambini con polmonite complicata da quelli con polmonite non complicata, il sierotipo 1 risulta significativamente associato con i casi più complicati e quelli di età maggiore. Il ruolo predominante del sierotipo 1 in tutti i casi polmonite e soprattutto in quelli complicati è stato già descritto (19, 24-26). Tuttavia i dati qui presentati mostrano per la prima volta che in Italia il sierotipo 1 da solo causa più di un terzo delle polmoniti batteriemiche e la metà di quelle complicate. Il sierotipo 19A si piazza al terzo posto con il 15% con una maggiore prevalenza nei bambini più piccoli. Il sierotipo 14, che nell'ultima decade in Italia era uno dei più frequenti (27-28), si trova ora sotto il 5%.

Dopo la vaccinazione di massa si è assistito a uno shift verso i sierotipi non vaccinali (29) e a una conseguente decrescita del numero dei casi di malattia causati da sierotipi vaccinali (3, 30). Non è questo il caso dell'Italia dove la vaccinazione non è operata su scala nazionale ma è limitata solo a poche regioni (meno del 30% in totale). Tuttavia è improbabile che lo shift causato dalla vaccinazione PCV-7 possa essere l'unica causa dell'incremento del sierotipo 1 e 19A. Altri fattori come l'incremento spontaneo della frequenza del sierotipo 1, come dimostrato in Belgio in epoca pre vaccino (31), e un trend secolare per alcuni sierotipi dimostrato in USA (32, 33), possono aver contribuito al fenomeno che si registra ora in Italia.

I sierotipi vaccinali non sono mai stati diagnosticati in bambini vaccinati anche parzialmente con PCV-7. Tuttavia in questo momento storico, vista la distribuzione dei sierotipi che causano polmoniti complicate e non, in Italia si sente la necessità di un vaccino diverso dal 7 valente coniugato. Effettivamente il 65% di tutte le polmoniti e il 75% di quelle complicate sono causate da sierotipi che non sono inclusi nel PCV-7 ma che lo sono nel vaccino 13 valente.

Questo studio mostra una percentuale di C-CAP (polmoniti acquisite in comunità complicate) maggiore del 20% in linea con la percentuale dei paesi occidentali. In realtà negli ultimi anni la percentuale di C-CAP tra i bambini ospedalizzati è aumentata in diversi paesi nel mondo (24, 34-35) spostandosi dal 14% al 26% negli USA (19) e questo sarebbe dovuto a particolari sierotipi dello *Streptococcus pneumoniae*. I nostri dati dimostrano che la batteriemia dovuta allo pneumococco è tre volte più frequente nelle C-CAP (maggiore del 20%) rispetto ai casi non complicati. Un recente studio americano, confrontando i dati di pre e post vaccinazione, (7) ha dimostrato che è un clone pre vaccinazione la causa dell'aumento di C-CAP dovuto al sierotipo 1. Il prossimo obiettivo del nostro laboratorio è proprio quello di sequenziare il DNA batterico di tutti e 26 casi di polmonite dovuti al sierotipo 1 per ottenere simili conclusioni in Italia.

Nelle C-CAP la complicità più frequente è il versamento parapneumonico (sopra il 90%), seguita dall'empima (sopra il 30%) e dalla polmonite necrotizzante (5% circa).

Il presente studio ha incluso un gruppo di grandi dimensioni (177 casi) di bambini molto piccoli, al di sotto dei 2 anni di età. Un'analisi separata di questo gruppo ha dimostrato che, anche se il tasso di polmonite pneumococcica batteriemia è simile a quello dei bambini più grandi, il tasso di complicanze è notevolmente inferiore. Ciò

probabilmente è dovuto alla presenza nei bambini più grandi dei sierotipi più aggressivi come il sierotipo 1, che non è mai trovato in bambini sotto 2 anni, ma è presente in quasi il 50% dei casi nei bambini più grandi.

Tra le cause di CAP, lo *Streptococcus pneumoniae* gioca un ruolo di primaria importanza, ma rimane ancora sottostimato, dal momento che nei bambini CAP pneumococciche non batteriemiche sono probabilmente la grande maggioranza dei casi (6,23,36). In altri tipi di malattie come la meningite la possibilità di usare fluidi biologici come il liquor e tecniche sensibile come la RT-PCR permette di poter fare diagnosi di infezione pneumococcica nella maggior parte dei casi (14). La diagnosi di laboratorio di polmonite pneumococcica è più difficile, perché i casi di batteriemia sono limitati e nei bambini non è sempre disponibile un fluido biologico specifico (come liquido pleurico o lavaggio broncoalveolare). Altri biomarkers sono attualmente allo studio, ma fino ad ora la ricerca di anticorpi specifici o degli antigeni urinari hanno spesso dato risultati deludenti (37-40). Anche se la RT-PCR eseguita su sangue non è in grado di identificare tutte le polmoniti da pneumococco, essendo limitato ai casi di batteriemia, è senza dubbio uno strumento importante per ottenere un monitoraggio affidabile dei sierotipi circolanti. Inoltre, data la grande sensibilità di questo metodo, la sierotipizzazione molecolare effettuata direttamente sui campioni di sangue consente di diagnosticare un maggior numero di polmoniti pneumococciche batteriemiche in una finestra di tempo limitata e consente una valutazione epidemiologica più precisa. Infatti, vista la frequenza dei risultati positivi della cultura dimostrato nella presente lavoro, probabilmente sarebbe stata necessaria una popolazione di oltre 3000 casi di polmonite per ottenere 80 casi positivi con i metodi colturali. La RT-PCR è semplice ed è noto che è

per essere meno costosa (15) rispetto ai metodi che si basano sulla coltura. Rispetto alla PCR multiplex sequenziale potrebbe essere un ulteriore miglioramento (15) anche per i paesi in via di sviluppo dove i metodi molecolari hanno già dimostrato (17, 41), una sensibilità significativamente superiore a quella dei metodi che si basano sulla coltura.

BIBLIOGRAFIA

1. Fine MJ, Smith MA, Carson CA, et al. Prognosis and outcome of patients with community –acquired pneumonia. *JAMA* **1996**; 275:134-41.
2. Reingold A. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease – United States, 1998-2003. *MMWR* **2005**; 54: 893.
3. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al., Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugat vaccine *for the active bacterial core surveillance of the emerging infections program network*. *N Engl J Med* **2003**; 348: 1737-46.
4. Kaplan SL, Mason EO Jr, Wald ER, et al. Decrease of invasive pneumococcal infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* **2004**;113:443-9.
5. CDC. Invasive Pneumococcal Disease in Children 5 Years After Conjugate Vaccine Introduction --- Eight States, 1998—2005 *MMWR*, **2008**; 57;144-148;
6. CDC. Pneumonia Hospitalizations Among Young Children Before and After Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine United States, 1997—2006 *MMWR*, **2009**; 58:1-4.
7. Li ST, Tancredi DJ. Empyema hospitalizations increased in US children despite pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics* 2010;125:26-33.

8. Arai S, Konda T, Wad A, et al., Use of antiserum-coated latex particles for serotyping *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Immunol* **2001**; 45:159–62.
9. Lalitha MK, Thomas K, Kumar RS, Steinhoff MC. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by coagglutination with 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* **1999**; 37:263–65.
10. Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:124-31.
11. Shah SS, Alpern ER, Zwerling L, McGowan KL, Bell LM. Risk of bacteremia in young children with pneumonia treated as outpatients. *Arch Pediatr Adolesc Med.* **2003**;157:389-92.
12. Carrol E.D, Guiver M, Nkhoma S, et al. High pneumococcal DNA loads are associated with mortality in Malawian children with invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J.* **2007**; 26: 416-22.
13. Resti M, Micheli A, Moriondo M, et al., Comparison of the effect of antibiotic treatment on the possibility to diagnose invasive pneumococcal disease by cultural or molecular methods: a prospective observational study of children with proven pneumococcal infection. *Clin Therapeutics* **2009**; 31: 1266-73.
14. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, et al., Molecular detection and serotyping on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. *J Med Microbiol* **2008**; 57:1205-1212;
15. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Cortimiglia M, Canessa C, Becciolini L, Lippi F, de Martino M, Resti M. Realtime PCR is more sensitive than Multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. *PlosOne*, **2010**; 5(2): e9282.

16. Corless CE, Guiver M, Borrow R, [Edwards-Jones V](#), [Fox AJ](#), [Kaczmarski EB](#). Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* **2001** 39: 1553-58.
17. Saha SK, Darmstadt GL, Baqui AH, et al. Identification of Serotype in Culture Negative Pneumococcal Meningitis Using Sequential Multiplex PCR: Implication for Surveillance and Vaccine Design. *PLoS ONE* **2008** 3: e3576).
18. Azzari C, Resti M. Reducing carriage and transmission: the beneficial “side effect” of pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis*, 2008; 47:997-999.
19. Tan TQ, Mason EO Jr, Wald ER, et al., Clinical characteristics of children with complicated pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Pediatrics* **2002**;110:1-6.
20. Sawicki GS, Lu FL, Valim C, Cleveland RH, Colin AA. Necrotising pneumonia is an increasingly detected complication of pneumonia in children. *Eur Respir J*. **2008**;31:1285-91.
21. Rello J, Lisboa T, Lujan M et al. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest* 2009; 136: 832-40.
22. Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, et al., Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med*. **2009**;360:244-56.
23. Grijalva CG, Nuorti JP, Arbogast PG, Martin SW, Edwards KM, Griffin MR. Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: a time-series analysis. *Lancet* **2007**; 369: 1179–86

24. Byington CL, Hulten KG, Ampofo K, et al., Molecular epidemiology of pediatric pneumococcal empyema from 2001 to 2007 in Utah. *J Clin Microbiol.* **2010**;48:520-5.
25. Fletcher M, Leeming J, Cartwright K, Finn a; South West of England Invasive Community Acquired Infection Study Group. Childhood empyema: limited potential impact of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* **2006**; 25: 559-60.
26. Eastham KM, Freeman R, Kearns AM, et al., Clinical features, aetiology and outcome of empyema in children in the north east of England. *Thorax.* **2004**;59:522-5.
27. D'Ancona F, Salmaso S, Barale A, et al.; Italian PNC-Euro working group. Incidence of vaccine preventable pneumococcal invasive infections and blood culture practices in Italy. *Vaccine.* **2005**;23:2494-500.
28. Tarallo L., Tancredi F, Schito G, Marchese A, Bella A. Active surveillance of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in Italian children. *Vaccine* **2006**; 24: 6938-43.
29. Byington CL et al., Temporal Trends of Invasive Disease Due to *Streptococcus pneumoniae* among Children in the Intermountain West: Emergence of Nonvaccine Serogroups. *Clin Infect Dis* 2005; 41:21–9
30. Durando P, Crovari P, Ansaldi F, et al., Collaborative Group for Pneumococcal Vaccination in Liguria. Universal childhood immunisation against *Streptococcus pneumoniae*: the five-year experience of Liguria Region, Italy. *Vaccine.* **2009**; 27:3459-62.
31. Flamaing J, Verhaegen J, Vandeven J, Verbiest N, Peetermans WE. Pneumococcal bacteraemia in Belgium (1994 2004): the pre-conjugate vaccine era. *J Antimicrob Chemother.* **2008**;61(1):143-9.

32. Butler JC, Breiman RF, Lipman HB, Hofmann J, Facklam RR. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. *J Infect Dis.* **1995**;171:885-9.
33. Finland M, Barnes MW. Changes in occurrence of capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* at Boston City Hospital during selected years between 1935 and 1974. *J Clin Microbiol.* **1977**;5:154-66.
34. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **2009**;354:1543-56.
35. Hendrickson DJ, Blumberg DA, Joad JP, Jhavar S, McDonald RJ. Five-fold increase in pediatric parapneumonic empyema since introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* **2008**;27:1030-2.
36. Michelow IC, Olsen K et al., Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* **2004**; 113:701-07
37. Korppi M, Leinonen M, Ruuskanen O. Pneumococcal serology in children's respiratory infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2008**;27(3):167-75.
38. Scott JA, Mlacha Z, Nyiro J, et al., Diagnosis of invasive pneumococcal disease among children in Kenya with enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G antibodies to pneumococcal surface adhesin A. *Clin Diagn Lab Immunol.* **2005**;12:1195-201.
39. Hamer DH, Egas J, Estrella B, MacLeod WB, Griffiths JK, Sempértegui F. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis* **2002**;34:1025-8.

40. Adegbola RA, Obaro SK, Biney E, Greenwood BM. *Pediatr. Evaluation of Binax now Streptococcus pneumoniae urinary antigen test in children in a community with a high carriage rate of pneumococcus. Pediatr Infect Dis J* **2001**;20:718-9.
41. Morais L, Carvalho Mda G, Roca A et al., Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *J Med Microbiol* **2007**; 56: 1181-4.

Figura 1. Distribution dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* negli 80 casi of CAP pneumococcica batteriemica.

Figura 2. Percentuale dei sierotipi di *Streptococcus pneumoniae* nei bambini con o senza polmonite complicata.