

IMMUNITÀ MUCOSALE NELLE INFEZIONI DELLE VIE AEREE

Gestione dei pazienti con infezioni respiratorie ricorrenti e nuove evidenze scientifiche del lisato batterico polimicrobico PMBL, ottenuto per lisi meccanica e somministrabile per via orale.

Prof. Giovanni Di Perri

Clinica delle Malattie Infettive, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli studi di Torino

Prof. Guido Ferlazzo

Laboratorio di Immunologia e Biotecnologie Terapeutiche, Dipartimento di Patologia Umana, Università di Messina

Infezioni acute respiratorie: una domanda di cura intensa e ingravescente

In un contesto occidentale si stima che le infezioni delle vie respiratorie siano responsabili del 20% degli accessi al consulto medico e del 75% delle prescrizioni di antibiotici.¹ Le infezioni acute delle vie respiratorie rappresentano quindi una domanda di cura intensa ed ingravescente per tutte le articolazioni di cura previste dai sistemi sanitari. Per ingravescente si intende non solo un aumento delle prestazioni sanitarie da dedicare a questo specifico contesto, ma anche il fatto che oggi si curano pazienti mediamente più gravi rispetto ad alcune decadi or sono.

Il denominatore principale che caratterizza questa tendenza è rappresentato dall'aumento della durata della vita nei paesi occidentali che si è verificato in particolare negli ultimi 50 anni. Oggi si stima che per i cittadini di entrambi i generi l'attesa di vita superi gli 80 anni,² ma accanto a questo indiscutibile beneficio "quantitativo" occorre tener conto del fatto che gli anni di vita ricevuti in aggiunta rispetto a quanto atteso mezzo secolo fa si connotano inevitabilmente per una maggiore vulnerabilità anche alle malattie da infezione. In termini di epidemiologia delle infezioni delle vie respiratorie ciò prende la forma di una maggiore incidenza e di una maggiore gravità degli episodi infettivi di varia natura ed eziologia, con particolare riferimento alle infezioni virali e batteriche.

È interessante notare come da un recente studio sistematico sull'incidenza e mortalità delle infezioni delle basse vie respiratorie, ad onta di un significativo calo planetario della mortalità nella fascia d'età compresa fra 0 e 5 anni (-37% fra il 2005 ed il 2015), gli stessi parametri epidemiologici indagati indicano un aumento nei soggetti di età superiore ai 70 anni.³ L'età gioca un ruolo progressivo nel generare un aumento di incidenza delle infezioni delle basse vie respiratorie, come testimoniato da uno studio di sorveglianza retrospettiva effettuato nel Regno Unito negli anni 1997-2011, che rileva - attraverso un'opportuna stratificazione per età - un valore di incidenza doppio fra i soggetti compresi nell'intervallo 85-89 anni rispetto al primo strato d'età considerato rappresentativo della senescenza (65-69 anni).⁴

Un ruolo sinergico viene qui interpretato dalle diverse condizioni di meiotopia individuale che tipicamente incidono in età matura e non solo, e la cui evoluzione, pur in parte contenibile dall'adozione di migliori stili di vita e da un altrettanto evoluta terapia medica, determina un vivere quotidiano progressivamente invalidante in molti aspetti. Ci si riferisce evidentemente sia alle patologie croniche delle stesse vie respiratorie (p. es. asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva) che ad altre forme di malattia a maggiore espressività sistemica (p. es. scompenso congestizio di cuore, diabete, vasculopatie, etc), per le quali il fine terapeutico è realisticamente rappresentato dal loro miglior possibile controllo, ovvero dalla ricerca del miglior equilibrio funzionale attuabile nel singolo paziente.

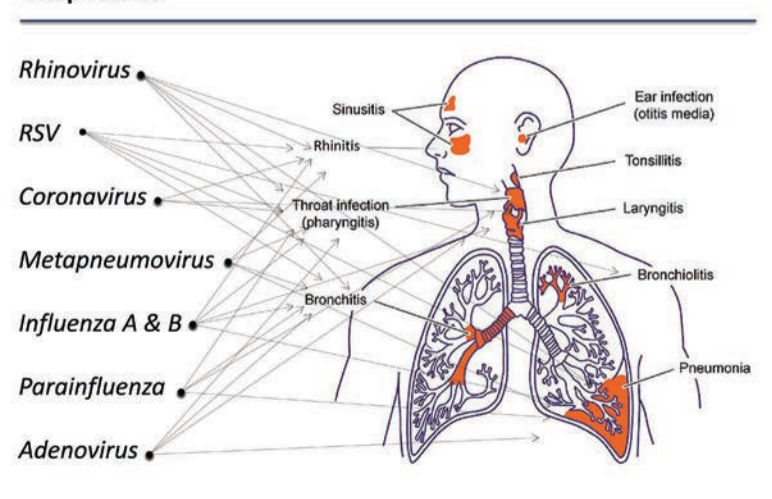
In questo ampio contesto di salute pubblica, gli episodi acuti di infezione a carico delle vie aeree comportano spesso la rottura di

questo equilibrio faticosamente raggiunto e mantenuto, creando di fatto non solo dei momenti di progressione stessa delle cronicità individuali, ma anche dei veri e propri rischi di vita. A ciò si associano inoltre sia il ricorso ai ricoveri ospedalieri che alla prescrizione di antibiotici, entrambi fattori co-protagonisti in un ciclo vizioso ad effetto sinergico nella generazione e diffusione delle resistenze batteriche nei riguardi degli antibiotici.

Benché le infezioni delle vie respiratorie possano essere distinte, secondo un'economia classificativa di ordine anatomico, in infezioni delle alte e delle basse vie respiratorie, vi sono alcuni aspetti morfo-funzionali nonché eziologici ed epidemiologici che le riconducono ad un corpo unico. La continuità epiteliale con le sue pur diversificate funzioni di difesa meccanica e flogistico-immunitaria, la sovrapposizione di numerosi agenti eziologici virali e batterici, nonché il legame fisiopatologico fra insulto delle vie aeree superiori ed eventuale evoluzione verso la compromissione delle vie respiratorie inferiori, ci descrivono una realtà che, almeno nei suoi aspetti preventivi, va considerata appunto non disgiunta.

Un tipico esempio in tal senso può essere rappresentato dallo sviluppo di polmonite in corso di influenza. Sebbene i dati in proposito siano sorprendentemente scarsi⁵ ad onta del fatto che si tratta della virosi respiratoria maggiormente studiata, la consecutio fra malattia influenzale tipica e la successiva insorgenza in una minoranza di pazienti di polmonite (sia essa attribuibile allo stesso virus influenzale oppure a sovrapposizione batterica) rappresenta certamente un modello fisiopatologico esportabile in diversi altri contesti, e più in generale nell'area delle infezioni respiratorie contratte in comunità. Il virus influenzale presenta uno spiccato tropismo per le cellule epiteliali delle vie aeree, a livello delle quali trova il suo opportuno pabulum replicativo. La replicazione virale comporta una sorta di esfoliazione dell'epitelio respiratorio e l'attività neuraminidasi del virus altera l'acido sialico presente in superficie, determinando fra le varie conseguenze l'esposizione di entità recettoriali facilitanti l'adesività dello *Streptococcus pneumoniae*.⁶

Tabella 1. Principali Agenti Eziologici Virali delle Infezioni delle Vie Respiratorie

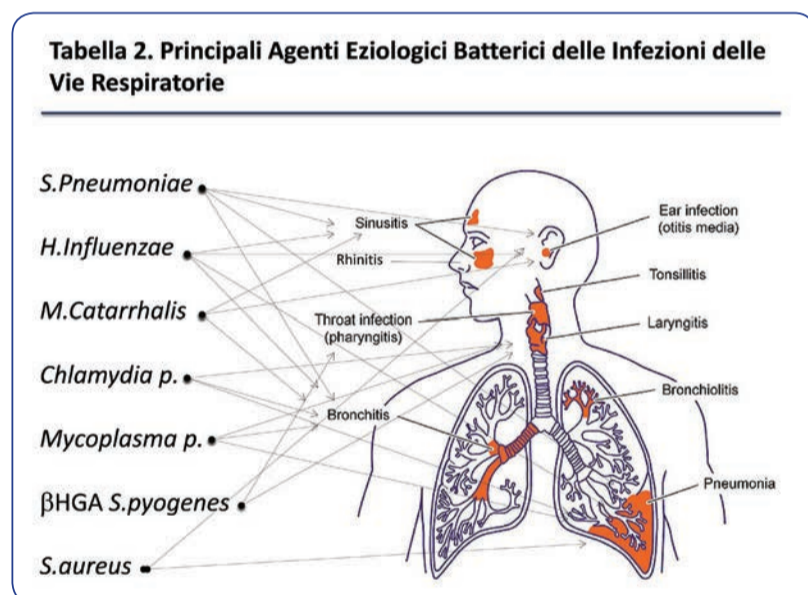


Di questo momento fisiopatologico fanno parte anche fenomeni di natura immunitaria, quale ad esempio la desensibilizzazione dei ligandi dei cosiddetti Toll-like receptors (TLR) successiva ad infezione da virus influenzale o da virus respiratorio sinciziale (RSV, respiratory syncytial virus), modifica quest'ultima che si associa ad un aumento del rischio di superinfezione batterica.⁷ Lo stato di vulnerabilità loco-regionale attribuibile ad un'infezione inizialmente confinata alle vie aeree superiori può quindi esitare nello sviluppo di polmonite in virtù dello stato flogistico delle mucose e quindi della modificazione di quell'equilibrio altrimenti commensale che caratterizza la presenza della flora microbica a livello delle vie aeree superiori.

Considerando la preponderante eziologia virale degli episodi infettivi acuti a carico dei distretti respiratori superiori, possono essere gli stessi virus respiratori a determinare lo sviluppo di polmonite, oppure a quest'ultimi è riconducibile il ruolo di *primum movens*, al quale segue la sovrapposizione di un'infezione batterica. Occorre considerare inoltre come lo sviluppo di un'infezione acuta delle vie respiratorie superiori può costituire un fattore di rischio per lo sviluppo di infezioni anche in altri distretti. È storica la nozione del rapporto che lega un'otite media, specie se cronicizzata e trascurata, allo sviluppo successivo di meningite pneumococcica,⁸ e di più recente acquisizione è lo stesso rapporto descritto fra infezioni delle vie respiratorie superiori e meningite meningococcica.⁹

Microbiologia delle Infezioni delle Vie Respiratorie

L'età del paziente può condizionare sia la frequenza di determinate forme di infezione delle vie respiratorie che la stessa eziologia. Nelle due tabelle sono indicati i patogeni principali, virali e batterici, associati a distinte entità morbose delle vie respiratorie.



Pur con alcune eccezioni (p. es. la faringite da *Streptococcus haemolyticus* di Gruppo A), si può notare una certa "promiscuità" per quanto concerne l'associazione fra patogeni e specifiche forme di malattia, ad ulteriore testimonianza che si tratta di un sistema "aperto", nel quale fra l'altro è facile individuare da parte del medico la presenza di forme miste, ovvero di quadri nei quali sono presenti componenti associabili a forme di malattia diverse. È il caso, ad esempio, della laringo-tracheite, della rino-faringite, della tracheo-bronchite, etc.

Nella maggior parte dei casi, nelle infezioni delle alte vie respiratorie (URTI) l'identità del patogeno, almeno inizialmente, è virale. Ciò vale in particolare per le aree respiratorie esterne al complesso osteo-meatale, ovvero alle cavità pneumatiche delle ossa, e ci si riferisce a rinite, faringite, laringite e tracheo-bronchite. In considerazione della continuità epiteliale che caratterizza l'anatomia delle vie aeree, l'ispessimento flogistico delle mucose e la conseguente restrizione degli orifizi di drenaggio può comportare in seconda istanza un'estensione dell'infezione ai seni nasali, paranasali, etmoidi ed all'orecchio medio. Complice la riduzione o

l'interruzione del deflusso delle secrezioni flogistiche dalle cavità dei seni e dell'orecchio medio, può svilupparsi un'infezione batterica all'interno delle stesse cavità.

Una sintomatologia caratteristica nell'otite media acuta, ad esempio, è l'ipoacusia secondaria alla chiusura infiammatoria delle Trombe di Eustachio, che collegano il retrofaringe all'orecchio medio, così come, in caso di sinusite, il dolore evocato con la digitopressione in corrispondenza delle cavità dei seni. In armonia con la visione unitaria delle vie aeree, è importante rilevare come i principali patogeni batterici in causa nelle URTI (sinusite ed otite in particolare) siano gli stessi in causa nelle polmoniti batteriche tipiche, vale a dire da germi convenzionali o tipici (p.es. *Streptococcus pneumoniae* ed *Haemophilus influenzae*).

In termini epidemiologici occorre considerare come la trasmissione interumana di patogeni batterici quali *S. pneumoniae* ed *H. influenzae* non è immediatamente associabile allo sviluppo di malattie sostenute dagli stessi germi, in quanto si tratta di microrganismi capaci di prolungata vita saprofitica nell'orofaringe umano in seguito a colonizzazione. La colonizzazione stessa è un fenomeno tipico della nostra vita di relazione, ed in armonia con la stagionalità delle infezioni respiratorie, questa tende ad avvenire maggiormente nelle stagioni fredde. Di conseguenza, gli eventi che portano in ultima istanza allo sviluppo di forme morbose sostenute da questi patogeni vengono necessariamente a verificarsi in presenza di colonizzazione. Si potrebbe di fatto concludere che si tratta di specie non stabilmente colonizzanti l'orofaringe umano ma che comunque tali sono per lunghi periodi di tempo.

Si stima che lo stato di portatore asintomatico di *S. pneumoniae* sia compreso fra valori del 20-40% in età pediatrica e fra il 5 ed il 10% negli adulti.¹⁰ I soggetti portatori di condizioni di aumentata vulnerabilità (p.es. broncopneumopatie croniche, diabete, etc) sono ovviamente a maggior rischio di malattia nel caso vengano colonizzati. Si tratta di una popolazione batterica mobile, in continuo passaggio interumano e come tale esposta alle diverse pressioni selettive che i diversi fattori in gioco possono esercitare. Ci si riferisce evidentemente alla risposta immunitaria umana, alle vaccinazioni ed all'esposizione a farmaci ad azione antibiotica.

Antibiotico-resistenza

La resistenza antimicrobica in questi anni ha mostrato volti diversi in funzione delle popolazioni di pazienti prese in esame, dell'area geografica e del contesto epidemiologico considerato. Sebbene i quadri peggiori siano documentabili in ambiente ospedaliero, è opportuno ricordarci di come la selezione e diffusione di stipti batterici farmaco-resistenti riconosce un denominatore allargato non solo alla medicina territoriale ma anche all'impiego industriale di antibiotici. Ciò vale a dire che se è vero che i fenomeni di maggior rilevanza si registrano nel contesto delle infezioni nosocomiali, è anche vero che la generazione di farmaco-resistenza nei riguardi degli antibiotici, in termini quantitativi, avviene soprattutto al di fuori dell'ospedale.

In proposito si consideri ad esempio come in uno studio europeo di sorveglianza sul consumo di antibiotici, comprendente anche l'Italia, nel 2008 il consumo di antibiotici in termini di DDD/1000 abitanti è risultato essere di 28.3 nella medicina di base e di 2.3 in ospedale.¹¹ Questi dati ineludibilmente richiamano ad una responsabilità allargata a tutto l'ambito prescrittivo, considerando come in particolare alcuni aspetti di accumulo di resistenza plurifarmacologica richiedono tappe sequenziali di esposizione/selezione agli antibiotici, il che evidentemente ci descrive un ipotetico ma realistico percorso in più tempi, durante i quali un determinato clone batterico può essere esposto ad antibiotici al di fuori del contesto nosocomiale e quindi accedere ad esso in uno stato di compromissione della propria sensibilità agli antibiotici già avanzato e quindi incline ad ulteriori acquisizioni di resistenze.

Si consideri inoltre come il bersaglio quantitativamente più significativo in proposito è rappresentato dalla flora intestinale. Anche in questo caso si parla quindi di un sistema "aperto", nel quale la circolazione di

soggetti nella comunità, negli ospedali, negli ambulatori ed in vari centri di aggregazione (scuole, asili, palestre, etc.) comporta un altrettanto vario movimento delle popolazioni batteriche associate a loro volta in grado di colonizzare/infettare a vario titolo e modo i nuovi ambienti ai quali accedono. La Tabella 3 riporta dati italiani ed è tratta dall'ultima descrizione analitica relativa alla resistenza agli antimicrobici registrata in Europa nel 2017.¹² Vengono evidenziate alcune specie batteriche la cui posizione in termini di antibiotico-resistenza è considerata particolarmente critica in questi anni.

Questi dati hanno due limitazioni di senso opposto; a) la prima è do-

tivo ma anche applicativo, alle diverse possibilità di immunomodulazione quale strumento di contrasto alle infezioni batteriche.¹³ In particolare gli Autori sostengono la possibilità di intervenire sull'immunità innata, quale prima linea di difesa nei riguardi degli organismi patogeni. Il riferimento funzionale è essenzialmente all'immunità di superficie, ed in particolare al ruolo delle cellule epiteliali e dei fagociti residenti nello stesso spessore epiteliale. La capacità delle cellule epiteliali della mucosa di riconoscere attraverso meccanismi di interazione recettoriale le cellule batteriche è seguita dall'attivazione di meccanismi di difesa cellulare

e dalla produzione di mediatori solubili in grado a loro volta di reclutare altre componenti immunitarie cellulari della risposta nella sede di infezione. Di ciò fanno parte anche la stimolazione di una risposta sistemica (p. es. febbre) e di una risposta microbica locale riconducibile sempre all'immunità innata e coinvolgente anche i fagociti.

Questa forma di immunità precede e sostiene lo sviluppo di una forma di risposta immunitaria caratterizzata dalla specificità del riconoscimento antigenico (immunità adattativa) mediata in particolare da linfociti B e T, in un meccanismo cooperativo integrato comprendente in ultima analisi la sintesi di anticorpi specifici e la citotossicità antigene-specifica, nonché la creazione di cellule memoria antigene-specifiche. La possibilità di individuare i Toll-like receptors (TLR) come bersaglio di un intervento di stimolo sull'immunità in-

nata viene descritta nelle sue capacità potenziali ed anche in riferimento agli ormai numerosi approcci clinicamente validati in tal senso. La capacità di specifici TLR di riconoscere, ad esempio, il lipopolisaccaride batterico (LPS) o l'acido lipoteicoico rappresenta un patrimonio funzionale dell'immunità di superficie sfruttabile ai fini di creare un primo argine funzionale alle infezioni batteriche. Si tratta di meccanismi a genesi ed efficacia soprattutto loco-regionale, ivi compresa la sintesi di IgA mucosali, diversi dalle vaccinazioni convenzionali che determinano un effetto sostanzialmente sistemico.

In questo contesto di revisione e rivalutazione di possibili interventi atti a sostenere i fisiologici processi di difesa umana in risposta a microorganismi patogeni trovano utile spazio i lisati batterici, preparati costituiti da frammenti antigenici ottenuti da lisi chimica o meccanica.¹⁴ In uso clinico da decenni, i lisati hanno visto crescere negli anni una vivace letteratura scientifica comprendente sia indagini che ne hanno delucidato maggiormente le proprietà ed i meccanismi d'azione, così come studi clinici che ne hanno saggiato l'efficacia in diverse circostanze e condizioni d'uso.

Occorre ammettere che, in particolare sui meccanismi d'azione, ne sappiamo molto più oggi rispetto a quando gli stessi prodotti entrarono in commercio e ciò testimonia un interesse sui lisati e sulla possibilità di sfruttarne le capacità immunomodulanti che è cresciuto nel tempo.¹⁵ Il contenuto antigenico dei lisati comprende frammenti di popolazioni batteriche patogene appartenenti a specie comprese a vario titolo nell'ecologia microbica delle vie respiratorie superiori. Il metodo di estrazione delle componenti antigeniche può essere chimico o meccanico, ed in particolare quest'ultimo consente una maggiore preservazione delle caratteristiche antigeniche originali (PMBL, lisato batterico polimicrobico ottenuto per lisi meccanica).¹⁶

Il razionale d'utilizzo è quello di mimare un'infezione batterica senza

	Cefalosporine iniettive 3 ^a generazione	Carbapenemi	Fluoro-chinoloni	Aminoglicosidi	Aminopenicilline
<i>E.coli</i>	25-50 %	<1 %	25-50 %	10-25 %	–
<i>K.pneumoniae</i>	>50 %	25-50 %	>50 %	25-50 %	–
<i>P.aeruginosa</i>	10-25 %	10-25 %	25-50 %	10-25 %	10-25 %
<i>Acinetobacter sp.</i>	–	>50 %	>50 %	>50 %	–

<i>S.pneumoniae</i>	Macrolidi 10-25 %	Penicilline 10-25 %
<i>S.aureus</i>	Meticillina (Oxacillina) 25-50%	–
<i>E.faecalis</i>	Aminoglicosidi 25-50 %	–
<i>E.faecium</i>	Vancomicina 10-25 %	–

Tabella 3. Intervalli percentuali di resistenza a specifiche classi antibiotiche registrati in Italia nel 2017 per batteri Gram-negativi (sopra) e Gram-positivi (sotto).

vuta al fatto che gli isolati batterici analizzati sono soltanto quelli definiti come "invasivi", ovvero ottenuti da pazienti con forme morbose gravi e conclamate, e non riflettono quindi la totalità della popolazione batterica della stessa specie presente negli stessi ambiti geografici ed epidemiologici; b) i dati riportati si riferiscono a valori medi e non riflettono le numerose criticità in cui ci si trova di fronte ad isolati virtualmente resistenti alla totalità dei farmaci disponibili.

Benché parte del contenuto riassunto nella tabella 3 possa apparire fuori luogo per quanto concerne le infezioni respiratorie acquisite in comunità, in quanto sono elencati numerosi patogeni tipicamente nosocomiali, in realtà il senso di una rappresentazione complessiva delle maggiori criticità in tema di resistenze antibatteriche vuole ribadire il concetto di intercomunicazione fra i vari segmenti epidemiologici nei quali l'antibiotico-resistenza viene determinata e si diffonde. Con ciò si vuole enfatizzare come vi sia di fatto una condivisione di responsabilità ai diversi livelli di cura nel generare e mantenere in essere quei meccanismi che sottendono al fenomeno. Il richiamo universale ad un migliore e minore uso di farmaci antimicrobici trova appunto ampia giustificazione nell'analisi della complessa e radicata capillarizzazione del percorso di selezione continua a cui le specie batteriche vengono sottoposte.

I lisati batterici

Nella letteratura recente sulla crisi della terapia antibiotica viene fatto crescente ed esplicito riferimento ad altre misure profilattiche/terapeutiche in grado di migliorare il profilo complessivo della gestione delle infezioni. È interessante notare come una rinnovata enfasi venga posta sulla possibilità di modulare la reattività flogistica-immunitaria dell'ospite, un intervento evidentemente estraneo al processo di selezione di resistenze batteriche nei riguardi dei farmaci ad azione antibiotica.

Data già il 2012 una revisione pubblicata sulla rivista Nature Reviews Microbiology nella quale viene dato molto spazio, specula-

che vi siano batteri vivi replicanti, allo scopo di stimolare una risposta in grado di esercitare un potere inibitorio laddove ed allorché si creino le condizioni per lo sviluppo di un'infezione reale. Negli ultimi anni il meccanismo d'azione dei lisati è stato utilmente approfondito nelle sue diverse componenti effettrici, in particolare attraverso la validazione sperimentale della capacità di stimolare l'immunità innata. È emerso inoltre un ruolo importante nel coinvolgimento funzionale delle cellule dendritiche, il cui contributo nella genesi della risposta comprende anche il trasporto degli antigeni batterici agli organi linfoidi loco-regionali dove la risposta acquista specificità attraverso l'opportuna presentazione antigenica ai linfociti T, e cresce in consistenza con l'aumento della presenza di cellule natural killer (NK) attivate.^{17,18}

Nuovi contributi sperimentali hanno mostrato la capacità del PMBL di stimolare l'anticorpopoiesi da parte delle plasmacellule residenti nella mucosa respiratoria, con sintesi e rilascio di IgA secretorie.¹⁹ Di rilievo inoltre le proprietà del PMBL nella regolazione funzionale e biosintetica delle stesse cellule epiteliali respiratorie. L'impiego in un modello sperimentale in vitro di PMBL ha promosso la riparazione epiteliale, la sintesi di adherens junctions, ovvero di quei complessi proteici presenti all'interfaccia cellulare che partecipano al processo di maturazione cellulare e di comunicazione intercellulare, ed inoltre ha aumentato la sintesi ed il rilascio di peptidi antimicrobici da parte delle cellule epiteliali.^{20,21}

Si tratta di un rinnovato patrimonio di conoscenze che si affianca ad una letteratura clinica andata consolidandosi negli anni e nella quale il ruolo del PMBL ha fatto registrare numerose note positive per quanto riguarda una serie di parametri di efficacia saggiati in soggetti in condizioni cliniche diverse. Prendendo in considerazione solo gli studi caratterizzati da un profilo metodologico rigoroso, vale a dire i trials clinici sviluppati secondo un disegno comprendente la randomizzazione, il doppio cieco e l'uso del placebo, sono stati studiati complessivamente 513 pazienti divisi in 3 studi.

Nel primo studio clinico sono stati arruolati 47 soggetti di età media di 48 anni, con precedenti di almeno 3 episodi di URTI e due episodi febbrili negli ultimi 6 mesi.²² La somministrazione di PMBL vs placebo ha comportato la significativa riduzione del n. di episodi di URTI (7 vs 31, - 77%), e la riduzione altrettanto significativa di altri parametri accessori quali la durata degli episodi al 2° e 3° mese, la riduzione di frequenza e gravità di una serie di sintomi e segni quali tosse, rinorrea, dolore auricolare e faringodinia, nonché un aumento significativo del titolo sierico di IgM, IgG ed IgA e del titolo salivare delle IgA.

Nel secondo studio clinico sono stati arruolati 178 soggetti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO o COPD) di gravità medio-elevata, di età media di 67 anni, un FEV medio del 46% ed una media annuale di esacerbazioni batteriche della COPD (AECOPD) di 2.8 episodi/anno.²³ La somministrazione di PMBL vs placebo ha comportato una riduzione significativa della frequenza degli episodi di AECOPD (2.3 vs 2.9, -21%, p<0.05) e della durata degli episodi (10.6 vs 15.8, - 33%, p<0.05). Fra gli end point secondari da rilevare la riduzione significativa del ricorso al ricovero ospedaliero (31 vs 56, -45%), della durata media del ricovero (8.9 vs 10.5, -1.6 giorni), del tempo di ricovero (275 vs 590 giorni, -53%) ed un aumento della percentuale di remissioni complete (89.3 vs 81.8%) nonostante un minor numero di giornate di antibiotico-coterapia (8.7 vs 12.8 giorni). Da rilevare inoltre una ridotta percentuale di mortalità nei pazienti trattati con PMBL rispetto ai pazienti trattati con placebo (2 vs 6%).

Nel terzo studio clinico sono stati studiati 288 pazienti affetti da COPD di grado medio-grave, di età media di 69 anni, con un FEV del 52% ed un numero di AECOPD di 2.8 nell'anno precedente.²⁴ In contrasto con i dati relativi all'anno precedente di osservazione, nella casistica in oggetto il numero di episodi è risultato significativamente inferiore alle attese, con una percentuale dei pazienti arruolati che non è andata incontro ad episodi di oltre il 70%. Ciò è verosimilmente alla base del fatto che non è stata registrata una differenza di dignità statistica nella frequenza di episodi di AECOPD fra i soggetti in terapia con PMBL ed il gruppo placebo (0.51 vs 0.52). Ciononostante, fra gli end point secondari sono state registrate differenze significative a favore della terapia con PMBL in termini di giorni di ricovero ospedaliero (65 vs 162, -45%, p<0.001), di numero di giorni fra il primo ed il secondo episodio di AECOPD (123.9 vs 70.4, p<0.03), di giorni di febbre (22 vs 40, - 45%, p<0.001) e di giorni trascorsi in condizioni di salute scadenti (109 vs 171, -36%, p<0.001).

In un momento storico nel quale stiamo facendo i conti con una crisi senza precedenti per quanto concerne l'evoluzione della resistenza batterica agli antibiotici, questi dati non possono passare inosservati. Si consideri come del tutto recentemente è stato approvato dalla FDA un nuovo farmaco per la terapia antivirale dell'influenza, il Baloxavir marboxil, la cui superiorità rispetto al placebo è stata sostanziata dalla riduzione di 1 giorno del tempo trascorso con la febbre.²⁵ A prescindere dal fatto che questo nuovo antiinfluenzale ci sarà certamente utile in un prossimo futuro, occorre rilevare che se un giorno di febbre in meno vale l'approvazione della FDA, la magnitudo delle varie voci di beneficio che il PMBL ha mostrato di procurare laddove è stato cimentato in studi clinici caratterizzati da metodologia rigorosa, appare certamente degna di attenta considerazione.

La frequenza degli episodi di infezioni respiratorie, la loro durata, il peso della sintomatologia, il ricorso al ricovero ospedaliero, l'uso di antibiotici, sono fra i parametri risultati di fatto migliorabili con l'impiego di PMBL. L'associazione di questi dati clinici insieme a quanto di nuovo è stato evidenziato circa le modalità di azione del PMBL, ci descrivono uno strumento medico che trova un suo comprovato e rinnovato razionale, schematizzato nella tabella 4.

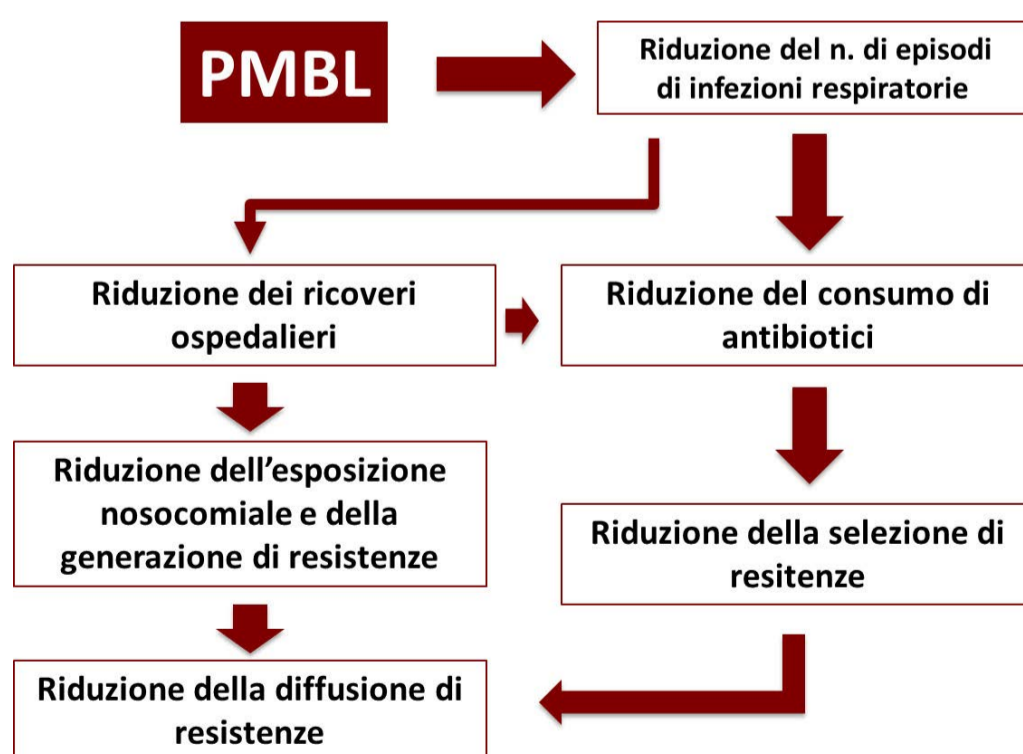


Tabella 4. Razionale dell'impiego del PMBL (Lisato Batterico Polimicrobico ottenuto per Lisi Meccanica) all'interno del complessivo processo gestionale delle infezioni delle vie aeree.

Articolazioni delle cure per la gestione ottimale dei pazienti con infezioni ricorrenti respiratorie

Dall'inizio della cosiddetta "era antibiotica", quella che stiamo vivendo è senz'altro la peggiore crisi in termini non solo di ristrettezza di farmaci disponibili ma anche, e forse soprattutto, in riferimento alle sue attuali coordinate evolutive. Lo sviluppo di strategie di salvaguardia multifattoriali, aggregabili nella denominazione corrente di "stewardship antimicrobica" è forse il primo tentativo strutturato di reazione sistemica della classe medica, ma non ci appare probabile che questo tentativo possa portare a breve termine ad una reale correzione di rotta di un fenomeno che è stato affrontato con colpevole ritardo.

Rispetto al passato ci vengono in soccorso alcuni interventi coadiuvanti di sensibile e provato valore applicativo, quali, ad esempio la vaccinazione anti-pneumococcica e quella anti-influenzale, in grado di ridurre l'impatto individuale e collettivo delle infezioni delle vie aeree in una popolazione mediamente più vulnerabile rispetto a pochi anni orsono. Un significativo miglioramento ci viene anche dall'area diagnostica, sia per quanto riguarda una più rapida diagnostica microbiologica delle infezioni gravi, che per quanto concerne la possibilità di identificare il patogeno in causa attraverso l'uso di tecniche non invasive (p. es. antigeni urinari per Pneumococco e Legionella, test salivari per l'influenza) anche in sede ambulatoriale. La situazione richiede un maggior impegno a tutti i livelli in cui si articolano le cure, e non possiamo permetterci di trascurare nessuno dei diversi strumenti che comunque abbiamo a disposizione.

Nuovi meccanismi di azione dei lisati batterici sulla risposta immunitaria della mucosa delle vie aeree

L'immunoterapia è un metodo per la cura delle patologie basato sull'impiego di sostanze che agiscono sul sistema immunitario. A seconda delle circostanze, l'immunoterapia ha lo scopo di indurre, amplificare o sopprimere una risposta immunitaria da parte dell'organismo.

Nell'ultimo lustro, diversi gruppi di ricerca hanno ottenuto risultati significativi dalle indagini sul coinvolgimento e l'uso potenziale del sistema immunitario del paziente nella terapia di numerose patologie: una strategia che prende appunto il nome di immunoterapia ed include terapie come quella degli anticorpi monoclonali, immunoterapie non-specifiche, terapia virus-oncologica, vaccini per il cancro, terapia a cellule T. Non per caso anche l'ultimo premio Nobel per la Medicina è stato assegnato "per le scoperte nel campo delle terapie contro il cancro mediante inibizione della regolazione negativa del sistema immunitario".

Ma naturalmente l'immunoterapia parte da molto più lontano, fin dalle vaccinazioni e, più recentemente, con l'introduzione dei lisati batterici nella prevenzione delle comuni infezioni umane. L'obiettivo originario di un approccio terapeutico basato su antigeni derivati da batteri era l'induzione di una specifica risposta immunitaria adattativa contro gli agenti patogeni che attaccano diversi organi, in particolare le infezioni delle alte e basse vie aeree.

Nonostante l'ampio utilizzo di questo approccio profilattico e parecchie evidenze di efficacia²⁶, sono tuttora scarse le informazioni disponibili sui fini meccanismi d'azione dei lisati batterici. Si può ipotizzare che i farmaci a base di antigeni batterici siano in grado di mediare la maturazione delle cellule dendritiche grazie alla presenza, nel lisato batterico, di un'idonea quantità di strutture molecolari che agiscono come ligandi dei principali recettori attivatori dell'immunità innata, i cosiddetti Pattern Recognition Receptors (PRR). Questi importanti recettori sono espressi da diverse cellule del sistema immunitario, tra cui i macrofagi e cellule dendritiche²⁷, e riconoscendo molecole associate ai patogeni attivano le cellule

In parallelo a quanto in essere in tema di ricerca su nuove molecole antibatteriche, la rinnovata attenzione che viene posta sulla possibilità di modulare favorevolmente la risposta immunitaria ci orienta ad una maggiore sensibilità nei riguardi di questa tipologia di intervento. Se da un lato le vaccinazioni disponibili ci permettono di creare un argine nei riguardi di specifici patogeni di riferimento prioritario per quanto concerne le infezioni delle vie aeree, un recupero di attenzione nei confronti dell'uso dei lisati batterici trova un preciso razionale quale intervento a fini preventivi, in particolare laddove il profilo individuale del paziente comprende una vulnerabilità individuale allo sviluppo di infezioni del tratto respiratorio. In riferimento a quanto documentabile per il PMBL, preparato ottenuto per lisi meccanica batterica e somministrabile per via sublinguale, sia per ciò che concerne i meccanismi d'azione che per quanto riguarda le risultanze di studi clinici randomizzati, un suo impiego può costituire un utile tassello accessorio all'interno di un complessivo processo gestionale delle infezioni delle vie aeree. Ciò non solo in un'ottica di minor ricorso alla terapia antibiotica, ma anche in considerazione di come possa oggi incidere la prevenzione anche di un singolo episodio infettivo a carico delle vie aeree nell'economia di un equilibrio precario in cui si trovano molti dei pazienti in età avanzata e/o affetti da comorbidità croniche multiple.

a cura di **Giovanni Di Perri**

immunitarie determinando l'inizio della risposta immune.

È stato infatti dimostrato che il lisato batterico è in grado di mediare la maturazione delle cellule dendritiche²⁸, un evento cruciale sia per l'induzione che per il completamento della risposta immunitaria, inclusa l'attivazione dei linfociti T e la produzione di anticorpi in grado di proteggere dai microrganismi patogeni. Il lisato impiegato in tale studio è un lisato batterico polivalente ottenuto per lisi meccanica (Polyvalent Mechanical Bacterial Lysates - PMBL), un farmaco disponibile in commercio per somministrazione sublinguale contenente una miscela di corpi microbici ottenuti da batteri uccisi meccanicamente, tra cui *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Hemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Klebsiella pneumoniae*.

In particolare, è stata dimostrata una maggiore capacità di indurre la maturazione delle cellule dendritiche da parte della miscela di ceppi batterici rispetto a singoli ceppi, in termini sia di espressione di un fenotipo attivatorio sia in termini di produzione di citochine e chemochine da parte di diversi sottogruppi di cellule dendritiche, incluse le mieloidi circolanti, le plasmacitoidi e quelle derivate da monociti²⁸. È inoltre di rilievo che anche la secrezione di IgA indotta naturalmente a livello salivare potrebbe subire un incremento significativo grazie alla stimolazione dell'immunità mucosale a livello orofaringeo, purché il lisato batterico polivalente ottenuto per lisi meccanica (PMBL) venga somministrato locoregionalmente, come ad esempio avviene mediante la somministrazione sublinguale²⁹.

Nonostante la chiara evidenza dell'attivazione di cellule dendritiche e della secrezione de novo di anticorpi IgA, i meccanismi d'azione dei lisati batterici sembrano tuttavia basarsi principalmente sulla risposta immunitaria innata³⁰ e, al momento, appaiono ancora solo parzialmente chiariti. Poiché i lisati batterici sono impiegati principalmente nel trattamento delle infezioni delle vie respiratorie, dovremmo iniziare a considerare la complessità della

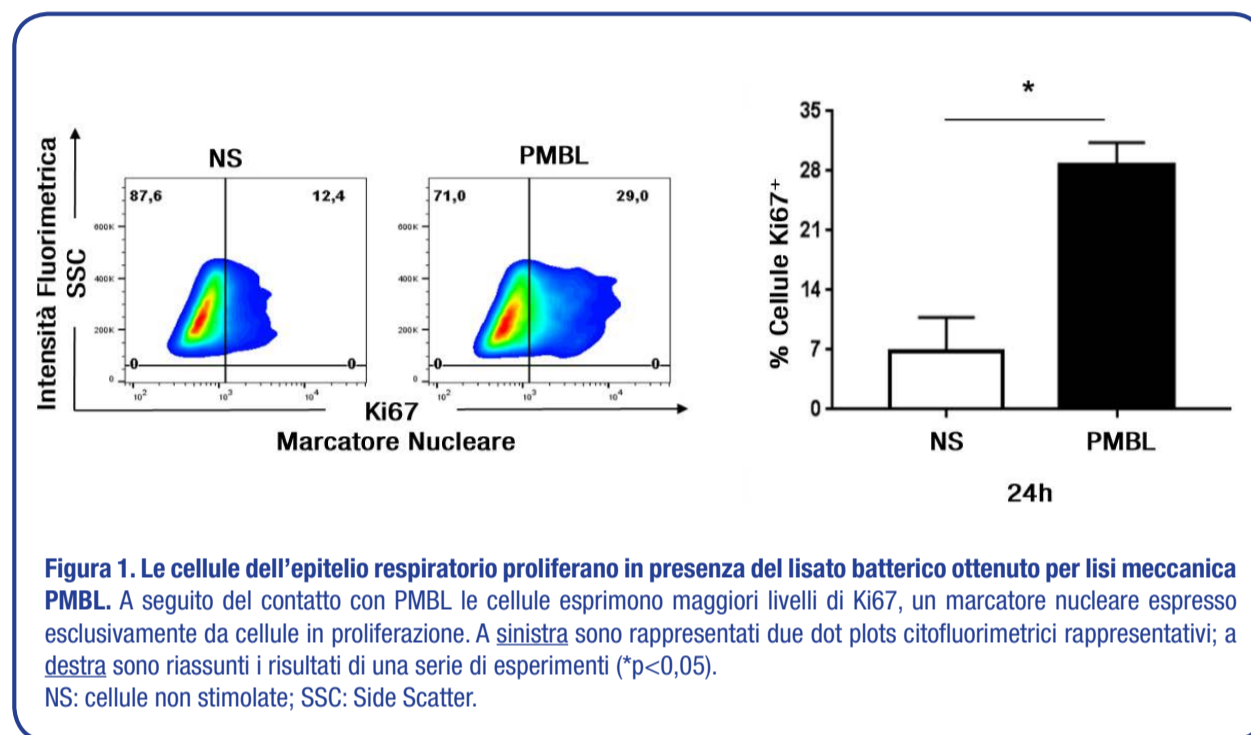
risposta innata a livello della mucosa delle vie aeree, che rappresenta il primo punto di contatto con i germi presenti nell'ambiente esterno. L'arsenale protettivo dell'epitelio delle vie aeree è costituito da barriere fisiche e da una vasta gamma di recettori e fattori antimicrobici che costituiscono il sistema immunitario innato. Molti dei recettori immunitari innati noti, rappresentati nell'insieme dai PRR sopra-menzionati, compresi i recettori Toll-like (TLR) e NOD-like (recettori del dominio di oligomerizzazione nucleotidica o NLR), sono espressi dall'epitelio delle vie aeree e portano alla produzione, da parte dell'epitelio mucosale, di citochine proinfiammatorie, chemochine ed altri fattori solubili che agiscono direttamente contro i microrganismi e/o reclutano nel sito di infezione le cellule immunitarie.

e nell'adesione cellula-matrice nonché al rilascio di fattori solubili ad azione microbica, quali i peptidi cationici anti-microbici.

Nuove evidenze sperimentali sul ruolo dell'epitelio respiratorio durante il trattamento con PMBL

Gli agenti patogeni presenti sulla superficie della mucosa entrano in contatto con le cellule epiteliali per poi danneggiarle o comunque superare tale tessuto di rivestimento e quindi invadere i tessuti sottostanti. Questo meccanismo patogenetico viene contrastato dall'esfoliazione epiteliale e dalla presenza di strette giunzioni inter-cellulari, mediate da molecole di adesione sulla superficie delle cellule epiteliali, che impediscono il passaggio dei microrganismi tra le cellule.

Ad esempio, nell'intestino distale dei mammiferi, che è continuamente esposto a microrganismi, l'epitelio ha una durata breve, con turnover di 5 giorni. Nei polmoni, esposti solo occasionalmente a microrganismi, l'epitelio è più duraturo, con turnover di 180 giorni, e l'esfoliazione epiteliale si verifica solo a causa di un'infezione o di una lesione³². Pertanto, la proliferazione delle cellule epiteliali nelle vie aeree, soprattutto di quelle superiori, è estremamente importante per la rigenerazione e il mantenimento dell'integrità della barriera mucosale e, conseguentemente, per aiutare a prevenire l'invasione dei patogeni. Nel nostro modello sperimentale, abbiamo utilizzato una linea di cellule epiteliali bronchiali



Il rilascio di fattori solubili da parte dell'epitelio delle vie aeree attivato dai microrganismi patogeni, e conseguentemente dai lisati batterici che contengono gli stessi profili molecolari dei patogeni, può anche influenzare la barriera fisica della mucosa, che a sua volta rappresenta parte dell'immunità innata delle vie aeree, come descritto in maggior dettaglio nel paragrafo successivo. Nello studio che riportiamo di seguito³¹, si dimostra che le cellule epiteliali umane delle vie aeree possono riconoscere direttamente il lisato batterico PMBL ottenuto per lisi meccanica e, di conseguenza, andare incontro a significativa proliferazione cellulare accompagnata da un aumento di molecole di adesione coinvolte nella giunzione cellula-cellula

umane (Human Bronchial Epithelial Cells - HBEpC) coltivate in presenza di lisato batterico (Ismigen®, Lallemand Pharma) alla concentrazione di 100 µg/ml. Le cellule sono state quindi raccolte e analizzate per (i) l'espressione del marcatore di proliferazione Ki67, (ii) per l'espressione di molecole di adesione coinvolte nelle giunzioni intercellulari, (iii) per il rilascio di peptidi anti-microbici. Dopo 24 h di coltura in presenza del lisato PMBL, si evidenziava un chiaro incremento, rispetto alle cellule non trattate, della proliferazione delle cellule epiteliali, dimostrato dalla maggiore espressione di Ki67, una proteina nucleare strettamente associata alla proliferazione cellulare (Figura 1). Come accennato precedentemente, le cellule della mucosa delle

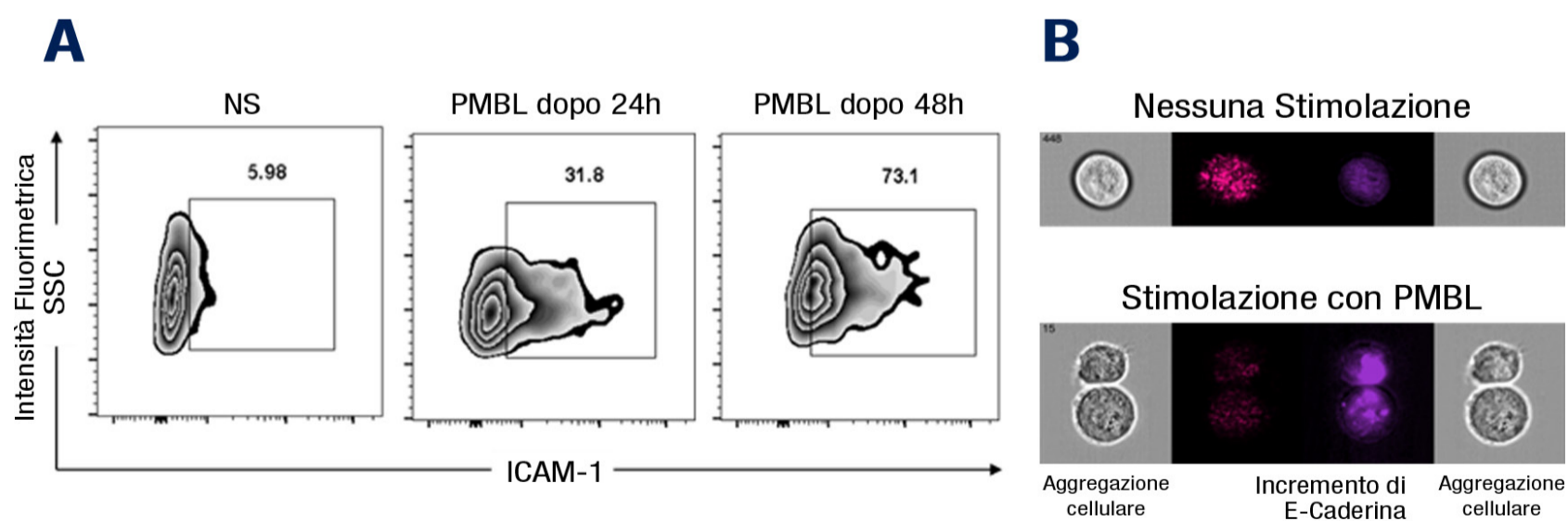


Figura 2. Il lisato batterico PMBL induce, nelle cellule epiteliali della mucosa respiratoria umana, l'espressione di molecole coinvolte nelle giunzioni cellula-cellula. A: L'incremento di ICAM-1 sulle cellule epiteliali bronchiali è tempo-dipendente; il dot plot della citometria a flusso mostra un incremento dell'espressione di ICAM-1 in due differenti intervalli di tempo (24 e 48 ore). B: Mediante citofluorimetria per immagini, si evidenzia che PMBL induce aggregazione cellulare ed incremento dell'espressione di E-Caderina (giunzioni aderenti) sulle cellule epiteliali bronchiali umane. ICAM-1 ed E-Caderina: molecole di adesione coinvolte nella giunzione cellula-cellula.
NS: cellule non stimolate; SSC: Side Scatter.

vie aeree fungono anche da barriera meccanica all'ingresso di microrganismi. Tuttavia, i microrganismi hanno sviluppato numerose strategie per attraversare questa barriera passando attraverso le giunzioni intercellulari.

Di converso, essendo costituita da cellule viventi, la barriera epi-

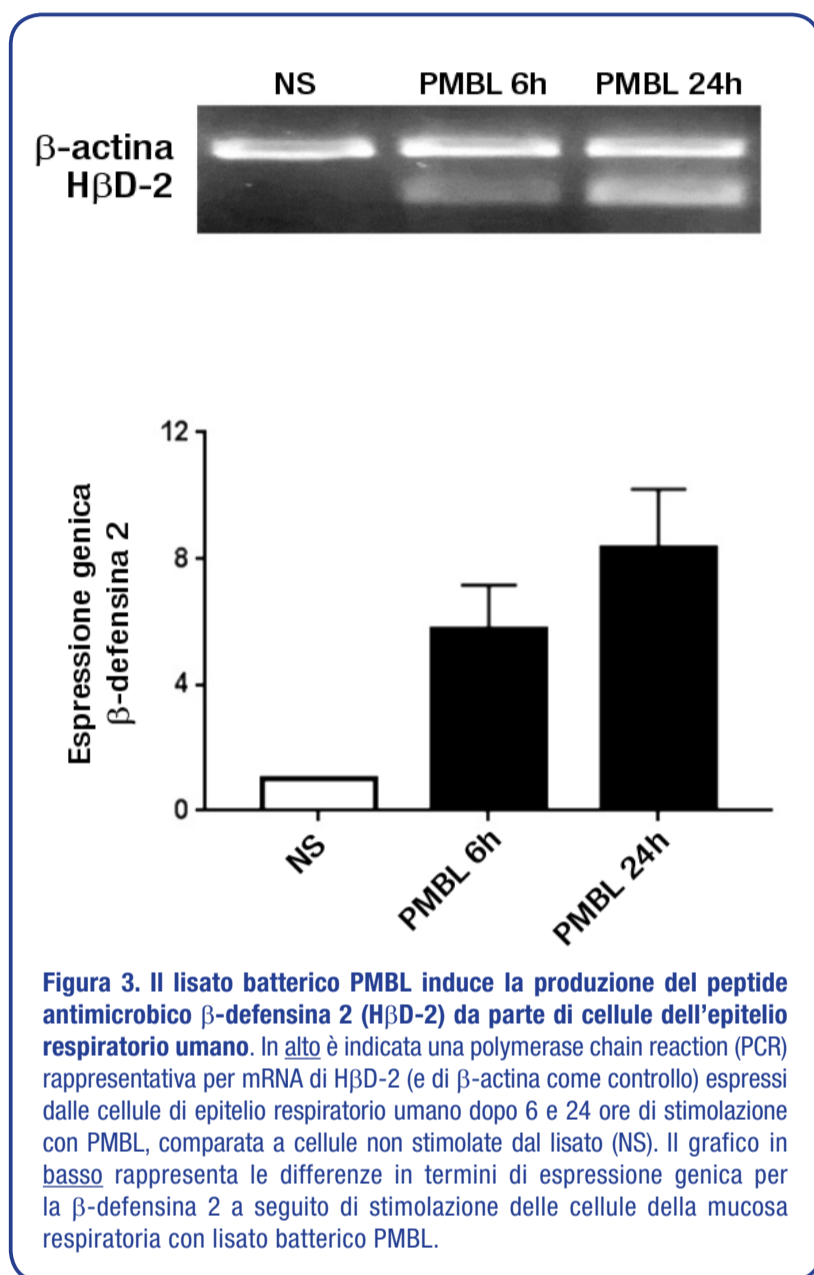


Figura 3. Il lisato batterico PMBL induce la produzione del peptide antimicrobico β-defensina 2 (HβD-2) da parte di cellule dell'epitelio respiratorio umano. In alto è indicata una polymerase chain reaction (PCR) rappresentativa per mRNA di HβD-2 (e di β-actina come controllo) espressi dalle cellule di epitelio respiratorio umano dopo 6 e 24 ore di stimolazione con PMBL, comparata a cellule non stimolate dal lisato (NS). Il grafico in basso rappresenta le differenze in termini di espressione genica per la β-defensina 2 a seguito di stimolazione delle cellule della mucosa respiratoria con lisato batterico PMBL.

teliale è dotata di plasticità nella sua abilità di resistere alla penetrazione microbica. Infatti, le funzioni della barriera epiteliale sono incrementate dai microrganismi stessi, presentando quindi una situazione dinamica durante l'infezione. Si può quindi prefigurare uno scenario simile quando i componenti batterici somministrati mediante il lisato entrano in contatto con le cellule epiteliali delle vie aeree.

Allo scopo di indagare se il lisato batterico ottenuto meccanicamente (Ismigen®) possa migliorare la funzione inducibile di barriera, abbiamo analizzato l'espressione delle molecole di adesione coinvolte nelle giunzioni cellula-cellula. In seguito alla coltura di cellule epiteliali bronchiali umane in presenza del lisato batterico, abbiamo osservato un incremento significativo dell'espressione di ICAM-1 ed E-Caderina sulle cellule epiteliali della mucosa respiratoria (Figura 2).

Le cellule epiteliali, ed in particolare quelle delle mucose, sono da considerarsi parte integrante della risposta immunitaria, proprio in ragione delle proprietà di barriera che vengono prontamente incrementate quando stimolate dalla presenza di microrganismi. Tra queste funzioni di barriera, più recentemente è stata dimostrata la capacità delle cellule epiteliali di rilasciare fattori solubili ad azione diretta anti-microbica.

Ciò avviene quando i PRR, i recettori attivatori dell'immunità innata

presenti sia sugli epitelii che nei leucociti, riconoscono molecole costituenti i microrganismi. Tali peptidi prodotti dall'epitelio possiedono spiccata attività anti-microbica nei confronti di batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi, miceti del genere *Candida* e sono inoltre in grado di inibire la replicazione di alcuni virus.

Il meccanismo d'azione di questi peptidi anti-microbici è principalmente riconducibile all'alterazione delle membrane cellulari dei batteri a seguito dell'interazione tra il peptide, carico positivamente, e le strutture di membrana dotate di carica netta negativa. Recentemente, i peptidi anti-microbici sono al centro di un rinnovato interesse scientifico a causa delle problematiche cliniche connesse alla antibiotico-resistenza. I peptidi anti-microbici sono infatti in grado di interagire sinergicamente con gli antibiotici convenzionali e sono inoltre efficaci nei confronti di batteri che hanno sviluppato antibiotico-resistenza, in quanto possiedono meccanismi d'azione differenti.

Tra questi peptidi anti-microbici, le β-defensine vengono rilasciate in elevati quantitativi dall'epitelio respiratorio ma non, ad esempio, da quello intestinale. Abbiamo quindi analizzato se, nel nostro modello sperimentale di cellule della mucosa respiratoria umana, fosse possibile indurre la produzione di β-defensina a seguito di stimolazione da parte del lisato batterico ottenuto per lisi meccanica. Come indicato in Figura 3, l'espressione genica di questo peptide è indotta dopo solo 6 ore di stimolazione con il lisato PMBL, indicando che, nel caso di somministrazione sublinguale (e non deglutendo la compressa di lisato), gli epitelii dell'orofaringe rilascerebbero peptidi ad elevata azione anti-microbica, quali la β-defensina, che si concentrerebbero quindi proprio nella principale regione di ingresso dei patogeni delle vie aeree, appunto la regione orofaringea.

Conclusioni

Il ruolo dell'epitelio delle vie aeree nel contrastare direttamente l'invasione di agenti patogeni è stato spesso trascurato rispetto al suo ruolo di produzione di fattori solubili (chemochine e citochine) in grado di attrarre ed attivare i leucociti durante i processi infiammatori. Similmente, è stato finora sottovalutato il ruolo dell'epitelio delle vie aeree nel mediare gli effetti protettivi dei farmaci a base di lisati batterici, i quali, mimando la presenza dei batteri, inducono a livello mucosale una serie di risposte finalizzate ad aumentare le barriere epiteliali ed al tempo stesso a ridurre la carica microbica. La maggiore comprensione delle funzioni protettive svolte dall'epitelio delle vie aeree, inducibili in presenza di lisato batterico, offre oggi una più precisa interpretazione dei diversi meccanismi attraverso i quali i lisati batterici svolgono il loro efficace ruolo nella prevenzione delle infezioni respiratorie. Appare comunque opportuno sottolineare che il ruolo protettivo svolto dall'epitelio delle vie aeree durante la somministrazione di lisati batterici rimane dipendente dalla via di somministrazione: infatti, solo una somministrazione locoregionale, quale quella sublinguale o intranasale, comporterà una valida attivazione dei meccanismi protettivi qui proposti poiché solo il contatto tra lisato e mucosa respiratoria potrà determinare la stimolazione delle cellule epiteliali proprio a livello delle vie di ingresso dei patogeni delle vie aeree, ad esempio il distretto orofaringeo.

La capacità del PMBL di mantenere l'integrità della barriera epiteliale, contrastare la colonizzazione microbica e, allo stesso tempo, stimolare la rigenerazione del tessuto mucoso durante le flogosi croniche, può svolgere un ruolo di rilievo nella profilassi delle infezioni delle vie aeree respiratorie e nella loro ricorrenza in pazienti con malattie infiammatorie croniche del tratto respiratorio, incluse asma e broncopneumopatia cronica ostruttiva.

a cura di **Guido Ferlazzo**

Bibliografia

1. Shann F et al. *Clin Infect Dis*. 1999;28(2):189-91.
2. <https://www.worldlifeexpectancy.com/italy-life-expectancy>.
3. GBD 2015 LRI Collaborators. *Lancet Inf Dis* 2017; 17: 1133-1161.
4. Millett ERC, et al. *PLOS ONE* 8(9): e75131.
5. Malosh RE, et al. *Vaccine*. 2018;36(1):141-147.
6. McCullers JA, Bartmess KC. *J Infect Dis* 2003; 187:1000-1009.
7. Didierlaurent A, et al. *J Exp Med* 2008; 205:323-329.
8. Kaplan DM, et al. *Ear Nose Throat J*. 2017 Jan;96(1):20-28.
9. Mueller JE, et al. *Scientific Reports* 2017; 7: 11570.
10. <https://ecdc.europa.eu/en/pneumococcal-disease/facts>.
11. Meyer E, et al. *International Journal of Medical Microbiology* 2013; 303: 388-395.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018.
13. Hancock REW, et al. *Nature Rev Microbiol* 2012; 10: 243-254.
14. Cazzola M, et al. *Current Opin Pharmacol* 2012; 12: 300-308.
15. Kearney SC et al. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2015; 114: 364 – 369.
16. Giovannini M, et al. *J Med Microb Diagn* 2014; 3:136.
17. Ferlazzo G, et al. *J Exp Med*. 2002;195(3):343-51.
18. Morandi B, et al. *Immunol Lett* 201;138(1):86-91.
19. Neutra MR, Kozlowski PA. *Nat Rev Immunol*.2006 Feb;6(2):148-58.
20. Evans SE, et al. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:413-35.
21. Bals R. *Respir Res*. 2000;1(3):141-50.
22. Tricarico D, et al. *Arzneimittelforschung*. 2004;54(1):57-63.
23. Cazzola, M. *Trends Med* 2006; 6: 191-199.
24. Braido F, et al. *Pulm Pharmacol Ther*. 2015 Aug; 33:75-80.
25. Hayden FG, et al. *N Engl J Med* 2018; 379:913-923.
26. Cazzola M, Anapurapu S, Page CP. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: A meta-analysis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012;25(1):62-8.
27. Baral P, Batra S, Zemans RL, Downey GP, Jeyaseelan S. Divergent functions of Toll-like receptors during bacterial lung infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014; 190(7):722-32.
28. Morandi B, Agazzi A, D'Agostino A, Antonini F, Costa G, Sabatini F, Ferlazzo G, Melioli G. A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating phenotype in human dendritic cells. *Immunol Lett*. 2011; 138(1):86-91.
29. Rossi GA, Peri C, Raynal ME, Defilippi AC, Risso FM, Schenone G, Palestini E, Melioli G. Naturally occurring immune response against bacteria commonly involved in upper respiratory tract infections: analysis of the antigen-specific salivary IgA levels. *Immunol Lett*. 2003; 86(1):85-91.
30. Clement CG, Evans SE, Evans CM, Hawke D, Kobayashi R, Reynolds PR, Moghaddam SJ, Scott BL, Melicoff E, Adachi R, Dickey BF, Tuvim MJ. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(12):1322-30.
31. Ferlazzo G. New insights into the mechanisms of action of mechanical bacterial lysates in the treatment of respiratory tract diseases. *Proceeding del XII World Congress on COPD, Asthma and Respiratory Allergy, Dubai (UAE), February 2-5, 2018*
32. Evans SE, Xu Y, Tuvim MJ, and Dickey BF Inducible innate resistance of lung epithelium to infection. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 413-435.