



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Biologia Molecolare

Elaborato di laurea

Aspetti molecolari ed epidemiologici della meticillino- resistenza in *Staphylococcus aureus*

Anno accademico 2008/2009



Laureanda: Patrizia Di Crescenzo

Tutor: Giulio Bertoloni, Dipartimento di Istologia, Microbiologia e
Biotecnologie Mediche

Sommario

Sommario	3
Abstract	5
Lista delle abbreviazioni	7
Introduzione	9
Biologia molecolare della meticillino-resistenza	11
Il problema della resistenza multipla	12
<i>Genetica della meticillino-resistenza</i>	12
Dagli ospedali alla comunità	13
<i>Differenziare CA-MRSA da HA-MRSA</i>	14
Epidemiologia	15
Implicazioni cliniche	18
Prevenzione e controllo	19
Tipizzazione molecolare	21
Conclusioni	23
Bibliografia	25
Ringraziamenti	27

Abstract

Lo sviluppo degli antibiotici ha permesso all'uomo di migliorare notevolmente la cura delle patologie causate dallo *Staphylococcus aureus*, ma la pressione selettiva esercitata dall'uso massiccio di queste sostanze sembrerebbe aver favorito lo sviluppo di varie forme di resistenza. Attualmente l'attenzione della comunità scientifica è richiamata dai ceppi meticillino-resistenti, per la particolare rapidità che mostrano nel diffondersi sia nell'ambiente ospedaliero che nella comunità. La meticillino-resistenza si deve alla presenza nel genoma di un elemento mobile, la *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec), codificante per una variante della *penicillin binding protein* con una ridotta affinità per la meticillina. La cassetta esiste in numerose varianti, alcune delle quali caratterizzate dalla presenza di determinanti di resistenza aggiuntivi. Dal momento che i ceppi MRSA hanno raggiunto livelli epidemici in numerose regioni, sono richiesti ulteriori studi epidemiologici, che si avvalgano anche di tecniche molecolari sempre più rapide e affidabili, affinché sia possibile elaborare delle strategie di risoluzione del fenomeno, o quanto meno di contenimento, compatibili con le realtà locali.

Lista delle abbreviazioni

CA-MRSA	Community acquired Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HA-MRSA	Hospital acquired Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
IS	Insertion sequence
MLST	Multi-locus sequence typing
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
p	Plasmid
PBP	Penicillin binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PVL	Panton-Valentine leukocidin
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i>
Tn	Transposon
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
VNTR	Variable number of tandem repeats

Introduzione

Lo *Staphylococcus aureus* è un batterio Gram-positivo potenzialmente patogeno che può causare un largo spettro di malattie, che spaziano da leggere forme cutanee a forme sistemiche che possono mettere a repentaglio la vita stessa del paziente: infezioni della pelle e di ferite post operatorie, infezioni polmonari, endocarditi, meningiti, pericarditi, nonché intossicazioni alimentari causate dall'ingestione di cibo contaminato da ceppi produttori di enterotossine (Livermore, 2000).

Dalla sua scoperta negli anni '80 del 1800 fino all'introduzione della penicillina, la mortalità dei pazienti infettati da *S.aureus* era dell'80% circa (Deurenberg *et al.*, 2007).



Figura 1. *Staphylococcus aureus*. Il nome deriva dalla tipica colorazione giallo oro.

(Deurenberg *et al.*, 2007).

L'introduzione della penicillina nei primi anni '40 ha rivoluzionato il trattamento delle infezioni da *S.aureus*, ma l'uso massiccio dell'antibiotico ha favorito dopo pochi anni la diffusione dei ceppi resistenti, isolati prima in ospedale e poi nella comunità. La resistenza risultava dall'acquisizione di un plasmide codificante una penicillinasi, cioè una β -lattamasi in grado di idrolizzare la penicillina

Nonostante lo sviluppo di altri antibiotici di origine naturale, lo scenario si ripeteva dopo pochi anni dalla loro introduzione, con un rapido sviluppo della resistenza, mediata da plasmidi e trasposoni (Livermore, 2000).

La necessità di trovare nuove sostanze che sopravvenissero al problema della resistenza dilagante, ha spinto a tentare la produzione di molecole sintetiche: da questa strada è nata la meticillina, caratterizzata da un voluminoso gruppo acile in 6' che impedisce stericamente l'attacco all'anello β -lattamico, conservando così la sua attività anche in presenza di β -lattamasi (Livermore, 2000).

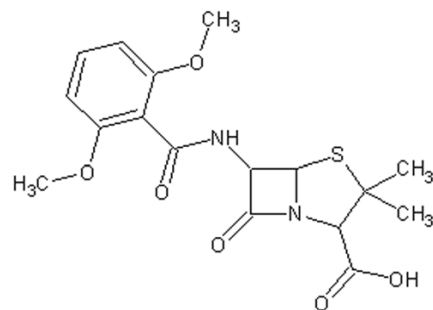


Figura 2. Struttura molecolare della meticillina.

Nonostante questo successo, il primo *S.aureus* meticillino-resistente (MRSA) è stato isolato l'anno stesso del lancio della meticillina sul

mercato (Livermore, 2000). I ceppi MRSA hanno acquisito e integrato nel loro genoma un elemento genetico mobile chiamato “*staphylococcal cassette chromosome mec*” (SCCmec), che porta il gene per la resistenza alla meticillina (*mecA*).

SCCmec è caratterizzato dalla presenza, alle estremità, di sequenze ripetute e invertite, due complessi genici essenziali (il complesso dei geni *mec* e il complesso dei geni *ccr*) e le regioni di giunzione (Zhang *et al.*, 2005):

- il complesso dei geni *mec* comprende le sequenze di inserzione (IS431*mec*), il gene *mecA*, e i geni regolatori *mecR1* e *mecI* intatti o tronchi;
- il complesso dei geni *ccr* codifica per la ricombinasi (*ccr*) che media l’excisione della cassetta e la sua inserzione, ed è pertanto responsabile della sua mobilità;
- le regioni fiancheggianti i complessi *mec* e *ccr* sono indicate come regioni J (junkyard), e non sembrano essere essenziali o utili per la cellula batterica, ad eccezione di alcuni casi in cui contengono geni per la resistenza ad altri antibiotici.

Fino ad oggi sono note tre classi di complessi *mec* (A,B e C) e quattro allotipi di complessi *ccr*, che combinandosi generano cinque diverse cassette SCCmec (I, II, III, IV, V), distinte in vari sottotipi a seconda delle differenze nelle regioni junkyard (Zhang *et al.*, 2005).

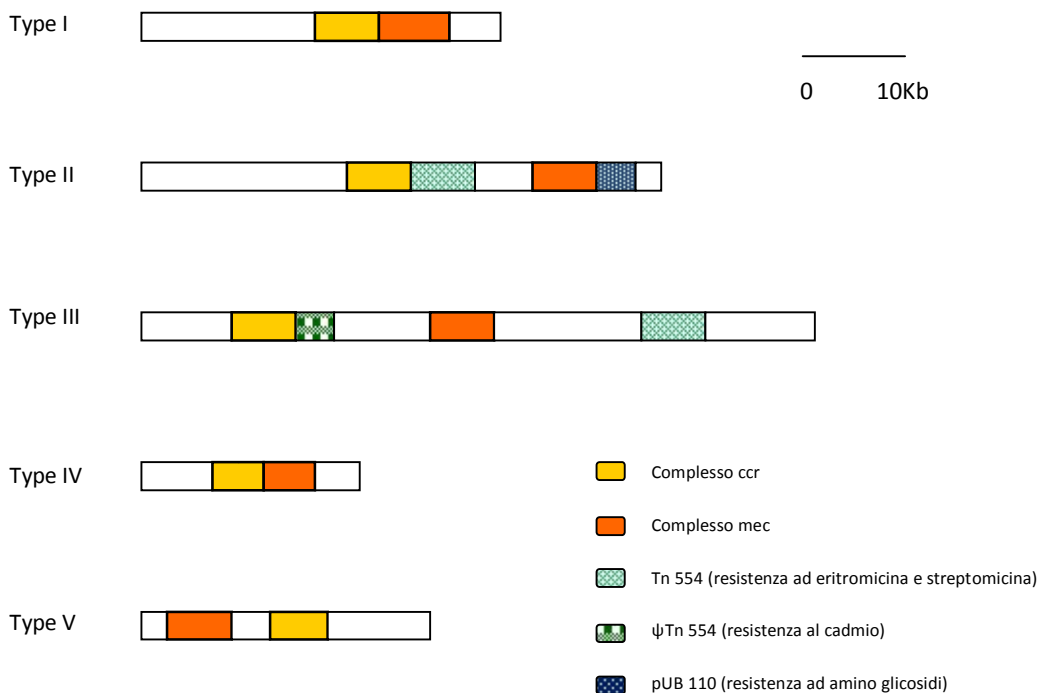


Figura 3. Rappresentazione schematica dei differenti tipi di SCCmec.

Biologia molecolare della meticillino-resistenza

S.aureus deve la sua resistenza alla meticillina alla presenza, nella cassetta, del gene *mecA*, che codifica per una variante della *penicillin binding protein* (PBP) indicata come PBP2a. Gli antibiotici β -lattamici normalmente agiscono legando le PBP in parete, inibendo la sintesi di peptidoglicano (componente fondamentale della parete batterica) e causando così la morte della cellula. La variante PBP2a è insensibile ai β -lattamici (non è in grado di legarli), pertanto può continuare la sua attività di sintesi anche in loro presenza, rendendo la loro azione del tutto inefficace (Deurenberg *et al.*, 2007). Si tratta sostanzialmente di una forma di resistenza dovuta alla produzione di un enzima analogo a quello bersaglio del farmaco, ma non suscettibile ad esso.

Il gene *mecA* è regolato dal repressore *MecI* e da un trasduttore del segnale transmembrana, *MecRI*, sensibile ai β -lattamici. In assenza di antibiotici β -lattamici, *MecI* reprime la trascrizione di tutti i geni del complesso *mec* (non solo *mecA*, ma anche *mecR* e *mecI*). In presenza di β -lattamici, *MecRI* attiva, mediante taglio autocatalitico, il dominio metallo-proteasi citoplasmatico, il quale scinde il legame fra *MecI* e la regione dell'operatore del gene *mecA*, consentendo la sua trascrizione e, di conseguenza, la produzione di PBP2a (Deurenberg *et al.*, 2007).

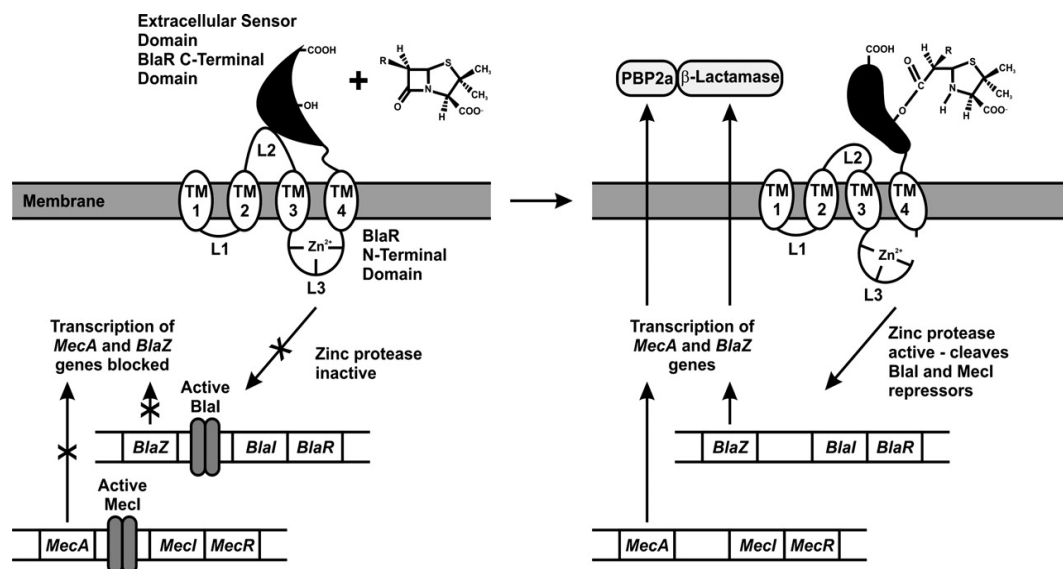


Figura 4. Meccanismo di trasduzione del segnale. E' rappresentato anche il cluster di geni *bla* che codificano per una β -lattamasi, determinando la resistenza alla penicillina.

Sebbene l'origine della cassetta mec non sia ancora nota, sono state avanzate due opposte teorie per descrivere la relazione fra i primi MRSA isolati e i cloni (Deurenberg *et al.*, 2007):

- secondo la teoria del “clone singolo”, la cassetta sarebbe stata introdotta in *S.aureus* una sola volta (per trasferimento orizzontale da una specie diversa di *Staphylococcus*), pertanto tutti gli MRSA attuali deriverebbero da un unico predecessore comune;
- la teoria dei “cloni multipli” ipotizza che ci siano stati diversi eventi di trasferimento che hanno coinvolto diversi lineage genetici di *S.aureus*.

Il primo ceppo MRSA, isolato nel 1961, portava nel suo genoma la cassetta di tipo 1°, e questo primo clone, detto “arcaico” (Deurenberg *et al.*, 2007), si è diffuso nel mondo durante gli anni '60. Nei quarant'anni successivi sono state caratterizzate le cassette di tipo II, III, IV e V, sono comparsi ceppi epidemici, e attualmente MRSA è ancora la principale causa di infezioni nosocomiali a livello mondiale.

Strategie atte a prevenire la diffusione di MRSA (particolarmente in seguito alla diffusione, negli ultimi anni, di ceppi “community-acquired”) richiedono una conoscenza dell'epidemiologia dei ceppi. A tale scopo sono state sviluppate varie tecniche di tipizzazione molecolare.

Il problema della resistenza multipla

Negli ultimi anni la letteratura medica ha assistito alla pubblicazione di centinaia di articoli riguardanti il fenomeno dei ceppi CA-MRSA. L'enorme interesse verso l'argomento ha sostenuto numerosi studi, ed è stato determinato dalla necessità di ottenere il maggior numero di informazioni possibili, nel tentativo di arginare un fenomeno che assume sempre più proporzioni globali.

La diffusione di ceppi meticillino-resistenti isolati dalla comunità (CA-MRSA), e distinti dalla controparte ospedaliera (HA-MRSA), è iniziata circa venti anni fa come fenomeno sporadico per raggiungere, negli ultimi anni, livelli epidemici in alcune regioni (Wijaya *et al.*, 2006).

Il problema principale della resistenza alla meticillina consiste nel fatto che le infezioni causate da MRSA sono difficili da trattare, poiché in molti casi i microorganismi sono suscettibili solo a glicopeptidi e farmaci sperimentali (Martins e Cunha, 2007).

Genetica della meticillino-resistenza

La resistenza multipla in MRSA è il risultato dell'acquisizione successiva, mediata da plasmidi e trasposoni, di determinanti di resistenza.

L'evoluzione verso la resistenza multipla è risultata, in particolare, dall'emergere di plasmidi coniugativi che hanno integrato al loro interno l'elemento Tn4001 (resistenza alla gentamicina) o altri trasposoni con vari determinanti di resistenza. Virtualmente, questo fenomeno potrebbe ora includere tutti gli antibatterici attualmente a disposizione (Witte, 1999). In vista della comparsa di ceppi resistenti alla vancomicina (al momento, il principale antibiotico utilizzato per trattare infezioni da MRSA), è necessaria una migliore conoscenza del meccanismo che sottostà alla meticillino-resistenza. Abbiamo già illustrato come la presenza del gene *mecA* nella cassetta SCCmec si traduca a livello molecolare nella produzione di una variante dell'enzima PBP resistente alla meticillina, ma al di là di questo elemento comune i cinque tipi di SCCmec che sono stati caratterizzati presentano importanti differenze.

I tipi I, II e III sono principalmente causa di infezioni nosocomiali (Martins e Cunha, 2007):

- l'SCCmec I è, fra i tre, il più piccolo, e non trasporta trasposoni o plasmidi che conferiscano resistenza oltre che alla meticillina;
- l'SCCmec II presenta, oltre al gene *mecA*, il trasposone Tn554, responsabile della resistenza all'eritromicina e alla streptomina;
- l'SCCmec III, l'elemento più grande fra tutti e cinque i tipi, presenta i trasposoni Tn554 e ψ Tn554 (resistenza al cadmio), e il plasmide pT181 (resistenza alla tetraciclina e al mercurio).

Il tipo IV è il principale responsabile di infezioni community-acquired. È un elemento piccolo e non presenta altri determinanti di resistenza oltre a *mecA*. In aggiunta, la presenza di sottotipi multipli sembra avvalorare l'ipotesi che l'SCCmec di tipo IV sia facilmente trasmissibile. I quattro sottotipi differiscono a monte del complesso *ccr*, in una sequenza nota come "regione L-C" (Martins e Cunha, 2007).

La cassetta di tipo V, scoperta più recentemente, ha dimensioni maggiori del tipo IV ma minori di tutti gli altri tipi. Possiede solo i geni che codificano per la resistenza alla meticillina, e presenta un nuovo tipo di gene *ccr* (detto "tipo c") in singola copia, a differenza degli altri elementi che contengono il gene in doppia copia (Martins e Cunha, 2007).

Dagli ospedali alla comunità

Dal 1961, ondate successive di MRSA epidemico si sono diffuse attraverso gli ospedali in tutto il mondo, a tal punto che l'MRSA è attualmente riconosciuto come il patogeno resistente agli antibiotici più comunemente isolato. A dispetto del suo successo nell'ambiente nosocomiale, l'MRSA è stato inizialmente isolato molto di rado nella comunità: è stato osservato che i primi ceppi identificati avevano una

velocità di crescita molto minore rispetto agli MSSA; ciò probabilmente rappresenta un costo della fitness delle cassette I, II e III, e potrebbe aver avuto un'importanza cruciale in un ambiente dove è assente la pressione selettiva esercitata dagli antibiotici (Wijaya *et al.*, 2006).

La ragione del recente improvviso aumento nel numero di casi di CA-MRSA non è ancora del tutto nota, ma sembra possa essere attribuita ai nuovi tipi di cassette (in particolare l'SCCmec di tipo IV) che sarebbero comparse in *S.aureus* negli ultimi decenni, ma che ora sono presenti in un numero maggiore di cloni rispetto alle prime tre identificate (tipi I, II e III). Le piccole dimensioni dell'SCCmec IV probabilmente permettono una maggiore promiscuità nel trasferimento orizzontale e non rappresentano uno svantaggio nella replicazione rispetto agli MSSA (Wijaya *et al.*, 2007).

Differenziare CA-MRSA da HA-MRSA

Tradizionalmente le infezioni che si manifestano entro 72 ore dal ricovero in ospedale sono definite "community-acquired", mentre quelle che si sviluppano dopo 72 ore in ospedale, nelle strutture a lunga degenza o nelle due settimane dopo la dimissione, vengono considerate nosocomiali (Padmanabhan e Fraser, 2005). Tuttavia il trend attuale spinge in direzione di una sempre minore permanenza ospedaliera e di un maggiore ricorso ai centri ambulatoriali, e i pazienti si muovono sempre più frequentemente dentro e fuori gli ospedali. Questo rende molto più difficile applicare le definizioni tradizionali per classificare le infezioni. Al momento, le infezioni vengono considerate community-acquired se sono presenti tutti i seguenti criteri (Padmanabhan e Fraser, 2005):

- la diagnosi dell'infezione viene fatta entro 48 ore dopo l'ammissione in ospedale;
- il paziente non ha una storia di infezioni da MRSA;
- il paziente non è stato ricoverato negli anni passati, e non è stato sottoposto a dialisi o interventi chirurgici;
- il paziente non ha cateteri o dispositivi medici attraverso la cute.

Fattori di rischio per HA-MRSA

Ospedalizzazione nell'anno precedente
Ricovero in strutture a lunga degenza
Interventi chirurgici
Uso di droga per endovena
Dialisi
Cateteri o altri dispositivi medici
Uso di antibiotici ad ampio spettro

In ogni caso, è noto che i pazienti potrebbero essere colonizzati da HA-MRSA per anni prima di sviluppare un'infezione e che, allo stesso modo, sono stati riportati casi di epidemie nosocomiali di CA-MRSA, pertanto ogni tentativo di distinguere CA-MRSA da HA-MRSA utilizzando criteri

puramente epidemiologici, non può essere considerato sensibile né specifico (Wijaya *et al.*, 2006).

Caratteristiche	CA-MRSA	HA-MRSA
Popolazioni a rischio	Popolazioni "chiuse" (detenuti, atleti, militari, tossicodipendenti, etc.)	Pazienti in strutture sanitarie
Condizioni sottostanti	Nessuna	Fattori di rischio associati a strutture ospedaliere
Età media	23 anni	68 anni
Resistenza agli antimicrobici	Suscettibile	Resistente
Genotipo	SCCmec type IV	SCCmec type I, II, III
Tossina PVL	Presente	Assente

Tabella 1. Principali differenze fra ceppi community-acquired e hospital-acquired.

Diversi studi hanno messo in luce due possibili marker molecolari per CA-MRSA:

- il gene per la Pantone-Valentine leucocidina, codificante per una tossina che agisce come fattore di virulenza; la sua presenza è riportata nella maggior parte dei casi di CA-MRSA in letteratura, ma la sua assenza non è una prova sufficiente ad escludere una possibile origine nella comunità. Un esempio di ciò si ha in Australia, in cui la maggioranza dei CA-MRSA isolati manca del gene PVL (Wijaya *et al.*, 2006).
- L'SCCmec IV, identificata in quasi tutti i CA-MRSA isolati. Si tratta di un elemento piccolo e semplice da trasferire orizzontalmente, che conferisce la resistenza alla meticillina ma mantiene la suscettibilità ad altri antibiotici (Padmanabhan e Fraser, 2005). L'associazione fra questa cassetta e CA-MRSA sembrerebbe univoca, ed è particolarmente importante per una distinzione dagli HA-MRSA, i quali, essendo dotati di SCCmec I, II o III, presentano spesso una resistenza anche a vari antibiotici non β -lattamici.

Epidemiologia

La frequenza delle infezioni causate dallo *S.aureus* meticillino-resistente continua ad aumentare a livello globale, sia nell'ambiente ospedaliero che comunitario. Questo a dispetto degli enormi progressi nelle terapie

mediche. Paradossalmente, le infezioni dovute al suddetto patogeno continuano a crescere nel numero e nella complessità non solo grazie alla sua capacità di adattarsi ai cambiamenti ambientali, ma anche alle migliorie nella cura dei pazienti (Boucher e Corey, 2008). E' ormai noto, ad esempio, che tra i molteplici fattori di rischio vengano citati la presenza di cateteri (Wijaya *et al.*, 2006) o di dispositivi cardiaci (Boucher e Corey, 2008), nonché i precedenti trattamenti antibiotici (Padmanabhan e Fraser, 2005). Di conseguenza il trattamento di queste infezioni è diventato sempre più difficile, con un incremento della patogenicità e della mortalità. E' stato stimato che nei soli Stati Uniti ogni anno muoiono circa 19.000 persone a causa delle infezioni da MRSA (Boucher e Corey, 2008). Lo *S.aureus* meticillino-resistente rappresenta sempre più un problema di salute pubblica con enormi conseguenze economiche: secondo uno studio canadese (Goetghebeur *et al.*, 2006) benché in Canada i livelli di MRSA siano molto più bassi che altrove, il costo annuale delle infezioni da MRSA è aumentato, tra il 1995 e il 2004, da 10.6 a 76.4 milioni di dollari, comprensivi di ospedalizzazione, barriere precauzionali, terapia antimicrobica e investigazione di laboratorio.

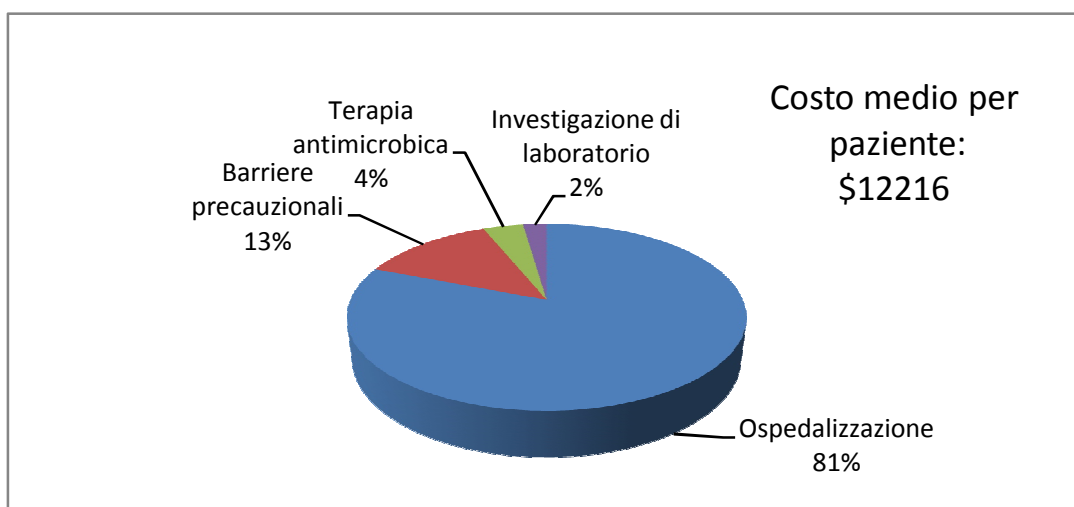


Figura 5. Spesa stimata per il sistema sanitario canadese per ogni paziente affetto da MRSA.

Per quanto riguarda le infezioni associate ad HA-MRSA, il loro incremento riflette il crescente impatto di dispositivi medici, l'età avanzata e la frequente copresenza di altre patologie. Probabilmente l'uso e abuso di antibiotici hanno contribuito all'emergere della resistenza. Sono state osservate variazioni geografiche sia negli Stati Uniti che in Europa, in cui l'incidenza varia dallo 0.5% in Islanda al 44% in Grecia dal 1999 al 2002. In accordo con numerosi studi, le infezioni da HA-MRSA comportano una notevole patogenicità e mortalità, ma esistono pareri discordanti sui motivi

di questa differenza: sono stati chiamati in causa i fattori di virulenza dell'MRSA, le differenze, soprattutto d'età, fra paziente e paziente, la scelta di terapie antibiotiche inefficaci (Boucher e Corey, 2008).

Cresce sempre più l'emergenza di pazienti infettati da MRSA in apparente assenza di fattori di rischio. Nel 1993 sono stati riportati casi di aborigeni australiani infettati, pur non avendo mai avuto contatti con il sistema sanitario. Diversi studi hanno dimostrato che i ceppi community-acquired si sarebbero evoluti da cloni MSSA presenti nella comunità, che possedevano il gene per la tossina PVL. L'inserimento della cassetta di tipo IV avrebbe così generato ceppi CA-MRSA dotati di un determinante di resistenza e della tossina. Ne risulta che le caratteristiche delle infezioni da CA-MRSA includono la mancanza di fattori di rischio associati ad ospedalizzazione, la suscettibilità a molti antibiotici non β -lattamici, genotipi distinti e distinti determinanti di virulenza. Benché non siano ancora stati stabiliti chiari fattori di rischio per questo tipo di infezioni, sono stati riportati casi di trasmissione da persona a persona, e scoppi di epidemie fra omosessuali, reclute militari, detenuti, atleti, donne nel periodo post-parto, tossicodipendenti che fanno uso di droga via intravenosa, bambini al di sotto dei 2 anni di età e anziani oltre i 65 anni. Numerosi studi hanno dimostrato che la prevalenza dei ceppi CA-MRSA varia geograficamente. Sono stati riportati casi di epidemie in tutto il mondo, dagli Stati Uniti all'Arabia Saudita, alla Nuova Zelanda (Boucher e Corey, 2008).

Molteplici studi epidemiologici hanno portato all'identificazione di 5 cloni pandemici di MRSA, che prendono il nome dalla regione geografica in cui sono stati isolati e caratterizzati per la prima volta (Martins e Cunha, 2007):

- Brasiliano, con SCCmec type IIIA;
- Iberico, con SCCmec type IA;
- Clone di New York/Giappone, con SCCmec type II;
- Ungherese, con SCCmec type III;
- Pediatrico (isolato in Colombia, Argentina, Polonia), con SCCmec type IV.

Fino ad ora la maggior parte dei ceppi ospedalieri con resistenza multipla è differente dai ceppi disseminati nella comunità, che risultano essere resistenti molto meno di frequente. La resistenza multipla sembrerebbe essersi sviluppata fra ceppi particolarmente adatti alla diffusione nell'ambiente ospedaliero (Witte, 1999); ciò non toglie che in futuro potrebbero verificarsi eventi di trasferimento orizzontale con i ceppi community-acquired, pertanto è richiesta un'intensa sorveglianza.

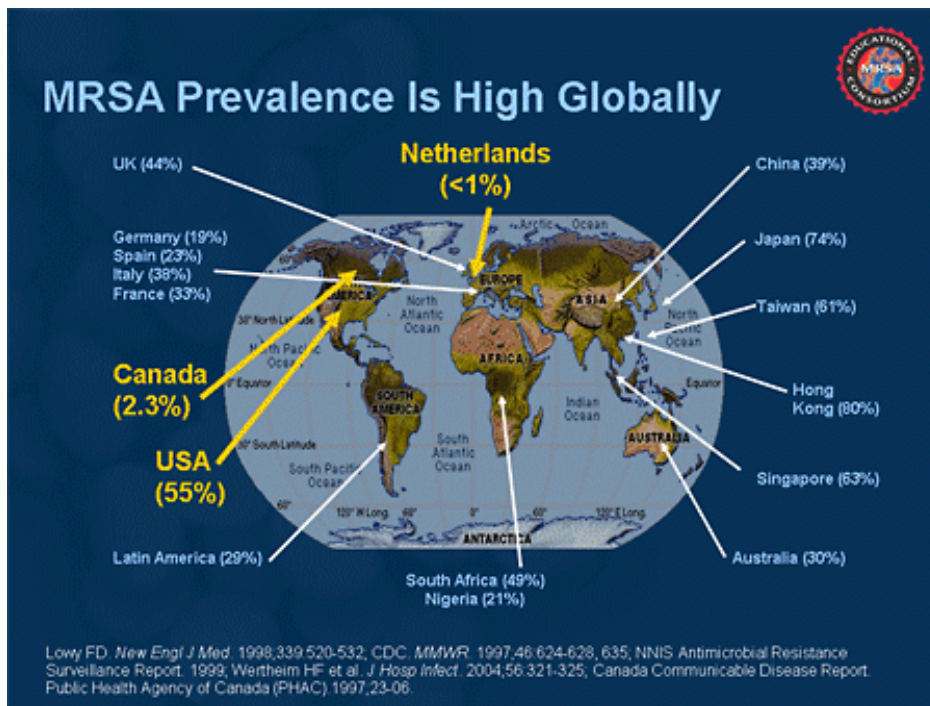


Figura 6. Diffusione dei ceppi MRSA nel mondo. La prevalenza è globalmente elevata.

Implicazioni cliniche

Per definizione, lo *S.aureus* meticillino-resistente non è suscettibile agli antibiotici β -lattamici e alle cefalosporine. Benché i ceppi nosocomiali presentino spesso determinanti di resistenza multipli, lo MRSA community-acquired tende ad essere suscettibile ai fluorochinoloni, aminoglicosidi e ad altri farmaci. In effetti il pattern di suscettibilità è uno dei principali strumenti per riconoscere i ceppi community-acquired. In generale, i CA-MRSA causano uno spettro di malattie simile a quello degli HA-MRSA. Le manifestazioni più frequenti riguardano infezioni della pelle e dei tessuti molli, ma sono stati descritti anche casi di patologie più gravi (Padmanabhan e Fraser, 2005).

L'emergere dell'MRSA nella comunità ha molteplici implicazioni (Padmanabhan e Fraser, 2005):

- la storia del paziente rimane uno strumento inestimabile per la scelta di una terapia adeguata; molto spesso, infatti, il paziente presenta fattori di rischio evidenti.
- La diagnosi microbiologica è sempre più importante quando la prescrizione di antimicrobici abituali deve confrontarsi con un livello di resistenza in così rapida crescita.

- I β -lattamici sono tuttora ritenuti i più appropriati per il trattamento di infezioni di pelle e tessuti molli, ma possono non sempre essere efficaci. Pertanto è necessario un controllo tempestivo e accurato della sorgente dell'infezione, nella forma, ad esempio, di un drenaggio.

Al momento, i pazienti che presentano patologie gravi con sintomi ricollegabili allo *S.aureus* vengono trattati con vancomicina. La terapia può essere successivamente adattata, nel momento in cui sono noti i risultati dell'esame colturale e dei test di suscettibilità (Padmanabhan e Fraser, 2005).

Le opzioni nei casi di resistenza multipla rimangono limitate; per i ceppi community-acquired le principali alternative sono la clindamicina e il sulfametoxazolo. Le infezioni particolarmente gravi vengono trattate con vancomicina per endovena (Padmanabhan e Fraser, 2005). Sono stati sviluppati nuovi agenti per il trattamento della resistenza ai β -lattamici, ma il loro costo elevato e la potenziale tossicità conseguente ad un uso prolungato ne limitano l'utilizzo (Padmanabhan e Fraser, 2005).

Prevenzione e controllo

La diffusione delle malattie causate dall' MRSA richiede strategie di prevenzione e controllo, sia nell'ambiente sanitario che nella comunità. Poiché l'MRSA si trasmette principalmente per contatto diretto con persone infette o con veicoli, l'igiene personale e dell'ambiente rappresenta la prima forma di difesa. Quando questo non è sufficiente si ricorre alla decolonizzazione, benché non ci siano ancora dati a sufficienza che dimostrino la sua efficacia. Le colture da siti anatomici molteplici combinate con nuove tecniche di laboratorio per un rapido screening, permettono una veloce identificazione dei carrier al momento del ricovero in ospedale. Benché la sorveglianza attiva sembri limitare efficacemente la diffusione delle infezioni nosocomiali, sono richieste ulteriori evidenze prima che questa strategia possa essere raccomandata per il controllo del fenomeno (Gleeson, 2008).

La prevenzione e il controllo delle infezioni da CA-MRSA è meno studiata, ma anche in questo caso le misure igieniche possono limitare la diffusione e le infezioni ricorrenti.

Il controllo delle infezioni da HA-MRSA è focalizzato su 4 punti (Gleeson, 2008):

1. Igiene delle mani
2. Identificazione e isolamento dei carrier
3. Decolonizzazione del paziente

4. Decontaminazione ambientale

- 1) L'igiene delle mani è il principale componente della strategia preventiva e di controllo negli ospedali. Solitamente i ceppi nosocomiali vengono trasmessi per lo più attraverso le mani del personale medico-sanitario: diversi studi hanno dimostrato che la disinfezione con soluzioni a base di alcool e il lavaggio con acqua e sapone abbattano di molto la diffusione delle infezioni.
- 2) L'isolamento dei carrier è un ulteriore contributo alla prevenzione della trasmissione. Ciò comprende l'assegnazione di stanze singole o in comune con altri carrier o persone infette e l'uso, da parte del personale, di camice e guanti non sterili per ogni contatto con il paziente e con aree potenzialmente contaminate nell'ambiente del paziente.
E' dimostrato che il naso sia il serbatoio di *S.aureus*, ma altri siti potrebbero essere colonizzati, quali la gola e le ascelle. E' preferibile effettuare colture da siti multipli: in questo modo è possibile identificare circa il 25% in più di carrier.
- 3) Nel momento in cui le misure standard di prevenzione falliscono e il paziente va incontro ad infezioni ricorrenti, si tenta la decolonizzazione. In genere è prevista l'applicazione di una pomata a base di mupirocina alle narici due volte al giorno per 5 giorni, con l'aggiunta di lavaggi con clorexidina. L'efficienza della decolonizzazione non è stata ancora pienamente dimostrata, e poiché si teme l'emergere della resistenza alla mupirocina si raccomanda cautela nel pianificare una tale misura per gruppi di persone, quali gruppi sportivi o classi scolastiche.
- 4) Componente finale della strategia di controllo è la decontaminazione dell'ambiente. Studi dimostrano che nel 50% dei casi la contaminazione delle mani avviene per contatto con le superfici vicine al paziente. Anche dopo la pulizia, il 46% delle stanze precedentemente occupate da pazienti colonizzati mostrano tracce di MRSA nell'ambiente. I principali oggetti contaminati includono materassi, cuscini, sedie, pavimento e dispositivi elettrici.

Sebbene non ancora rigorosamente analizzata, la ricorrenza delle infezioni della pelle dovute a CA-MRSA viene stimata attorno al 10% o più. Quando le infezioni ricorrono, esse sono generalmente causate dallo stesso ceppo dell'infezione originaria, il che suggerisce che la decolonizzazione potrebbe prevenire la ricorrenza. La diffusione fra componenti della stessa famiglia o dello stesso gruppo di persone, quali squadre sportive, scuole, gruppi militari, è sempre più frequente. Il contatto diretto fra persone o con veicoli è la via principale di acquisizione dei ceppi CA-MRSA, pertanto le misure per limitarne la diffusione

riguardano la copertura delle ferite, il lavaggio delle mani, il lavaggio di vestiti, biancheria e asciugamani, e la decontaminazione ambientale (Gleeson, 2008).

E' stato messo a punto un vaccino contro i polisaccaridi capsulari dell'*S.aureus* in grado di conferire l'immunità ai pazienti sottoposti a dialisi, sebbene non a lungo termine. Lo sviluppo di un vaccino con un'efficacia a lungo termine potrebbe ridurre l'incidenza sia dell'MRSA che MSSA, nonché la severità delle infezioni (Gleeson, 2008).

Tipizzazione molecolare

Strategie atte a prevenire la diffusione dell' MRSA richiedono una conoscenza approfondita della sua epidemiologia. Per questo scopo sono state sviluppate diverse tecniche molecolari, che includono: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST), tipizzazione dell'SCCmec e della regione VNTR della proteina A (Deurenberg *et al.*, 2007).

PFGE. E' considerata lo standard di riferimento. E' stato dimostrato che è il metodo di tipizzazione con il maggiore potere discriminatorio. Si basa sulla digestione del DNA cromosomiale purificato con l'enzima di restrizione *SmaI*, seguita da elettroforesi su gel di agarosio. I pattern risultanti vengono analizzati con i parametri dell'UPGMA. Sforzi significativi sono stati fatti per armonizzare il protocollo e stabilire una nomenclatura standard, ma con scarsi risultati in termini di riproducibilità, rapidità e costi.

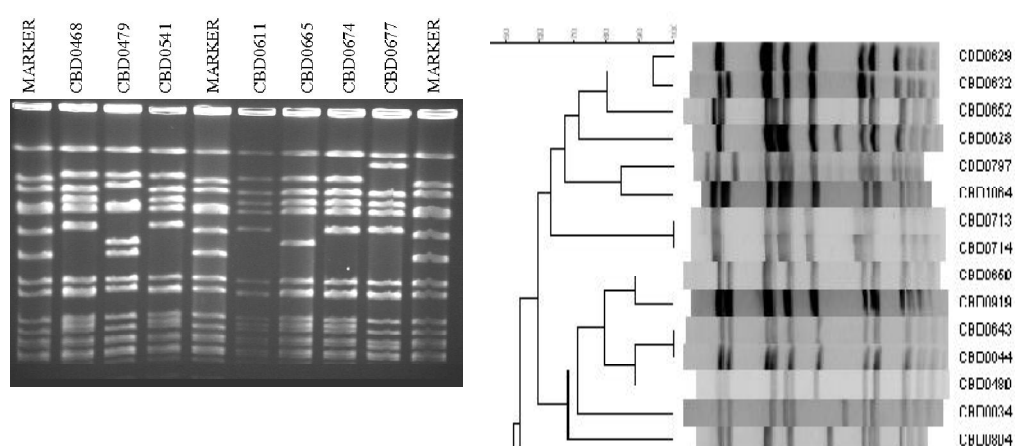


Figura 7. Esempio di pattern ottenuti con PFGE e di albero filogenetico costruito con i dati raccolti.

MLST. Si basa sull'analisi di sequenza di frammenti di 0.5kb da sette diversi geni costitutivi di *S.aureus*. Differenti sequenze contraddistinguono alleli diversi di questi geni, e ciascun isolato viene identificato da un determinato profilo allelico. L'analisi degli eventi evolutivi viene svolta definendo dei "complessi clonali", ovvero gruppi di ceppi accomunati dall'identità di sequenza per almeno 5 dei 7 loci. Il progenitore di ciascun complesso sarà il ceppo con il maggior numero di varianti single-locus. Si tratta di una tecnica piuttosto laboriosa e dispendiosa dal punto di vista temporale.

Strain	Source	State	arc C	aro E	glpF	gmk	pta	tpi	yqi	ST
CBD0467	blood	WA	1	4	1	4	12	1	10	5
CBD0468	wound	WA	3	3	1	1	4	4	3	8
CBD0471	urine	WA	1	4	1	4	12	1	10	5
CBD0472	blood	WA	1	4	1	4	12	1	10	5
CBD0479	wound	WA	3	3	1	1	4	4	3	8
CBD0482	wound	WA	1	4	1	4	12	1	10	5
CBD0541	wound	WA	3	3	1	1	4	4	3	8
CBD0542	blood	WA	1	4	1	4	12	1	28	105

Tabella 2. Esempio di risultati ottenuti mediante MLST.

SCCmec TYPING. Sono attualmente disponibili 4 metodi per la caratterizzazione del complesso mec, tutti basati su varianti della PCR e che si differenziano principalmente nella scelta delle regioni da amplificare.

- Oliveira e de Lencastre (2002) hanno sviluppato una PCR multipla nella quale vengono individuati e sei differenti loci, permettendo di tipizzare le cassette da I a IV.
- E' stato sviluppato un metodo in cui vengono amplificate parti delle strutture dei complessi *mec* e *ccr*.
- Una real-time PCR permette di caratterizzare gli SCCmec type I-IV sulla base dei complessi *mec* e *ccr*.
- Zhang *et al.*(2005), hanno sviluppato una PCR multipla che individua *mecA* e un singolo locus della cassetta, caratterizzando le cassette I-IV.

Questi metodi danno risultati differenti quando applicati allo stesso ceppo MRSA; inoltre ciascuno di essi determina proprietà strutturali diverse dell'SCCmec, pertanto sarebbe auspicabile lo sviluppo di un unico metodo per la classificazione delle cassette.

spa TYPING. Consiste nella tipizzazione di un singolo locus, la regione polimorfica X del gene per la proteina A di *S.aureus*. Questa consiste nella

ripetizione in numero variabile di una unità di 24pb. La sua varietà si attribuisce quindi principalmente a delezioni e duplicazioni, e più raramente a mutazioni puntiformi. Il vantaggio principale di questa tecnica è la sua semplicità. Il potere discriminatorio è intermedio fra la PFGE e la MLST. Esistono due principali sistemi di nomenclatura adottati a livello mondiale, ma la differenza fra i due rende difficile la comparazione dei dati pubblicati. Un ulteriore vantaggio offerto riguarda la possibilità di collezionare dati continuamente con lo scopo di tenere sotto controllo il diffondersi di un'infezione, e la possibilità di sviluppare un algoritmo elettronico che individui automaticamente l'insorgere di epidemie.

Strain	Source	Repeat Pattern	<i>spa</i> Type
CBD0467	Blood	R26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	2
CBD0468	Wound	R11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	8
CBD0471	Urine	R26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	2
CBD0472	Blood	R26-23-17-34-17-20-17-12-17-16	2
CBD0479	Wound	R11-19-12-21-17-34-24-34-22-25	8

Tabella 3. Esempio di *spa* type identificati in base al pattern di ripetizioni.

Conclusioni

Dal momento che la prevalenza dei ceppi meticillino-resistenti è ancora elevata in molte regioni, sia nell'ambiente ospedaliero che nella comunità, sono necessari ulteriori studi epidemiologici per migliorare la loro identificazione. Tali studi si avvalgono di tecniche sempre più precise per il riconoscimento dei diversi cloni, poiché caratteristiche quali la resistenza agli antibiotici variano molto fra i vari sottotipi. In attesa di nuovi risultati, la pratica clinica attuale dovrebbe riconsiderare con attenzione l'uso dei β -lattamici per pazienti con gravi infezioni causate da questo patogeno: oltre alle strategie atte a contenere il fenomeno, è ugualmente importante una corretta amministrazione nell'uso degli antibiotici, al fine di diminuire una pressione evolutiva che potrebbe generare organismi maggiormente resistenti.

Bibliografia

Boucher H.W., G.R. Corey. 2008. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **46**:S344-349.

Deurenberg R.H., C. Vink, S. Kalenic, A.W. Friedrich, C.A. Bruggeman, E.E. Stobberingh. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**:222-235.

Gleeson T.D. 2008. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Dis. Mon.* **54**:801-806.

Goetghebeur M., P.A. Landry, D. Han, C. Vicente. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a public health issue with economic consequences. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **18**:27-34.

Livermore D.M. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **16**:S3-S10.

Martins A., M.L.R.S. Cunha. 2007. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol. Immunol.* **51**:787-795.

Padmanabhan R.A., T.G. Fraser. 2005. The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *Cleve. Clin. J. Med.* **72**:235-241.

Wijaya L., L. Hsu, A. Kurup. 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview and local situation. *Ann. Acad. Med. Singapore.* **35**:479-486.

Witte W. 1999. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **44** Suppl A:1-9.

Zhang K., J. McLure, S. Elsayed, T. Louie, J.M. Conly. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* types I to IV in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5026-5033.

Ringraziamenti

Ringrazio il professor Bertoloni per l'attenzione e la cura con cui ha seguito il mio lavoro, per la pazienza nel risolvere i miei dubbi e il tempo dedicatomi.

E' doveroso da parte mia ringraziare anche tutte le persone che mi hanno permesso di essere qui oggi: ringrazio quindi infinitamente i miei genitori, Anna Maria e Antonio, e mio fratello Lorenzo. Loro sono la vera colonna portante che mi ha permesso di raggiungere questo obiettivo. Grazie per tutti i sacrifici fatti, per non avermi fatto mai mancare il vostro affetto, per avermi ascoltato nei momenti di sconforto. Non vi ringrazierò mai abbastanza.

Un grazie di cuore ai nonni, Tonino e Matilde, agli zii Paola, Fernando, Franco e Michela, e ai miei "cuginetti" Jasmine e Riccardo: loro sono in assoluto la mia più grande tifoseria! La nonna Matilde merita un ringraziamento speciale, per le sue mani d'oro e la cura che impiega nel preparare i suoi dolci, che spesso sono stati fondamentali nell'affrontare le difficoltà di questi tre anni!

Grazie dal profondo del mio cuore a Damiano per l'affetto infinito donatomi in questi due anni e mezzo insieme, per essere stato un po' la mia famiglia così lontano da casa, per tutte le volte in cui avevo bisogno di parlare e tu eri pronto ad ascoltarmi, per avermi dato una mano quando avevo bisogno di aiuto, per tutte le volte in cui tu mi capivi meglio di me stessa, e per i mille altri motivi che sappiamo entrambi nel nostro cuore, per cui non smetterò mai di ringraziarti e di dirti quanto ti voglio bene!

Un ringraziamento speciale anche a Daniella e Gabriele Rami, e ad Anna, per avermi accolto così tante volte nella loro casa, per avermi fatto sempre sentire una di famiglia, e per il loro aiuto nei momenti di difficoltà.

Mille grazie a Stefania, per tutti i momenti divertenti passati insieme, per le mille peripezie, e per avermi sempre offerto una spalla su cui piangere, e a Federica, l'amica di sempre, la dimostrazione vivente che la vera amicizia resiste anche alla lontananza.

E cosa sarebbe una persona senza i suoi amici? Ringrazio quindi tutti i ragazzi dei gruppi Giovani e Giovanissimi di Pieve di Curtarolo; tutte le mie amiche e compagne di collegio in questi tre anni, in particolare Valentina, Roberta, Elisa e Mariagrazia; tutti i miei amici e compagni di corso: Isabella, Federica, Paolo, Laura, Verena, Cristina, Erica, Giulia e Ilaria.

Grazie a tutti coloro che in questi tre anni mi hanno regalato un sorriso, mi hanno stretto la mano, hanno scambiato con me una parola..perché senza di voi probabilmente questa tesi ci sarebbe stata lo stesso, ma la mano che l'avrebbe scritta sarebbe stata certamente molto diversa..

Grazie, di cuore, a tutti voi.